

Untersuchungen über die Aktivität einiger
Fermente des oxidativen Teils des
Pentose-Phosphat-Weges im embryonalen
Säugetiergewebe und die Beeinflussung durch
6-Aminonicotinamid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Jürgen Barrach
aus Berlin

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. H. Herken

Untersuchungen über die Aktivität einiger
Fermente des oxidativen Teils des
Pentose-Phosphat-Weges im embryonalen
Säugetiergewebe und die Beeinflussung durch
6-Aminonicotinamid

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Jürgen Barrach
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. D. Neubert

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Coper



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 21.6.1973

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Untersuchungen zum Problem der Aktivitätsbe-</u> <u>stimmungen der G-6-PD in Gegenwart von 6-P-GD</u>	1
1.1.	Vorbemerkungen -----	1
1.2.	Eigene Untersuchungen -----	4
1.2.1.	Material und Methoden -.-.-.-.-	4
1.2.1.1.	Fermentpräparationen	4
1.2.1.2.	Optimale Bedingungen	7
1.2.1.2.1.	Bestimmung der G-6-PD -.-.-.-.-	7
1.2.1.2.2.	Bestimmung der 6-P-GD -.-.-.-.-	11
1.2.2.	Untersuchungen mit der GLOCK-MCLEAN-Methode II -.-.-.-.-	15
1.2.3.	Aktivität der G-6-PD im Hyaloplasma ohne -.-.-.-.- Zusatz von 6-P-GD zum Versuchsansatz -.-.-.-.-	22
1.2.4.	Messung der G-6-PD-Aktivität in Gegenwart -.-.-.-.- von 6-ANADP -.-.-.-.-	27
1.2.5.	Messung der G-6-PD-Aktivität in Gegenwart -.-.-.-.- von Schwermetall-Ionen -.-.-.-.-	37
1.2.5.1.	Versuche mit Cu ⁺⁺ -Ionen	38
1.2.5.2.	Versuche mit Zn ⁺⁺ -Ionen	43

2.	<u>Einfluß des Antivitamins 6-AN auf einige</u> <u>Stoffwechselvorgänge in Rattenembryonen</u>	45
2.1.	Vorbemerkung -----	45
2.2.	<u>Einfluß des Antimetaboliten 6-ANADP auf</u> <u>die Kinetiken einiger löslicher Fermente</u> <u>von Säugetier-Embryonen und Lebergewebe</u>	54
2.2.1.	Methode -.-.-.-	54
2.2.2.	Ergebnisse und Diskussion -.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-	60
2.3.	<u>6-P-Gluconat-Gehalt im embryonalen Gewebe</u> ----- <u>und 6-AN-Behandlung in-vivo.</u> -----	62
2.3.1.	Methode -.-.-.-	65
2.3.2.	Ergebnisse und Diskussion -.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-	66
2.4.	<u>In-vitro-Versuche mit radioaktiv mar-</u> ----- <u>kierten Vorstufen</u> -----	69
2.4.1.	Vorbemerkungen -.-.-.-.-.-.-.-	69
2.4.2.	Methode -.-.-.-	71
2.4.3.	Ergebnisse und Diskussion -.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-	72
2.4.3.1.	Einbau von ^{14}C -Glucose in den Ribose- anteil von Nucleinsäuren	72
2.4.3.2.	Acetat	74
2.4.3.3.	Aminosäuren	78

2.5.	Einfluß einer 6-AN-Behandlung des Mutter- ----- tiers auf das embryonale und foetale Wachstum	84
2.5.1.	Feuchtgewichtsbestimmung am Tag 20 -.-.-.-.- der Schwangerschaft	84
2.5.2.	DNA-Zuwachs bei Kontrollembryonen und Embryonen, -.-.-.-.- deren Muttertiere am Tag 11 der Schwangerschaft -.-.-.-.- mit 6-AN behandelt wurden	85
2.6.	Einfluß der Umgebungstemperatur der Muttertiere ----- auf die embryotoxische Wirkung von 6-AN	87
2.6.1.	Einleitung -.-.-.-.-	87
2.6.2.	Material und Methode -.-.-.-.-	87
2.6.3.	Ergebnisse und Diskussion -.-.-.-.-	89
2.6.3.1.	Temperaturkontrollen bei den Muttertieren	89
2.6.3.2.	Gewichtskontrollen der Muttertiere	93
2.6.3.3.	Teratologie	95
2.6.3.4.	Biochemische Untersuchungen	97
3.	<u>Programme zur mathematischen Bestimmung der</u> <u>Km-Werte und Vmax-Werte mit Standardabweichungen</u>	102
3.1.	Nichtschreibende Programme -----	103
3.1.1.	Nichtschreibendes Programm 1 -.-.-.-.-	103
3.1.2.	Nichtschreibendes Programm 2 -.-.-.-.-	105
3.1.3.	Nichtschreibendes Programm 3 -.-.-.-.-	106

3.2.	<u>Schreibende Programme</u>	109
3.3.	<u>Kodierung der Rechenschritte</u>	113
4.	<u>Zusammenfassung</u>	133

im Text benutzte Abkürzungen:

6-AN	6-Aminonicotinamid
6-ANAD	6-Aminonicotinamid-Adenin-Dinucleotid
6-ANADP	6-Aminonicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-PD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (E.C.1.1.1.49)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GSSG-Reduktase	Glutathion-Reduktase (E.C.1.6.4.2)
NAD (P)	Nicotin-Adenin-Dinucleotid (-Phosphat)
PPW	Pentose-Phosphat-Weg
6-P-G	6-Phospho-Gluconat
6-P-GD	6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase (E.C.1.1.1.44)

1. Untersuchungen zum Problem der Aktivitätsbestimmung der G-6-PD in Gegenwart von 6-P-GD.

1.1. Vorbemerkungen

Das Ferment Glucose-6-PD kommt neben den anderen Fermenten des PPW und den Fermenten der Glykolyse in der Hyaloplasma-Fraktion der Säugetierzellen vor (Cytosol-Fraktion). Als Substrat dient G-6-P und als Co-Faktor NADP^+ . Das Reaktionsprodukt ist das 6-Phospho- δ -Gluconolacton. Die im oxidativen Teil des PPW im Reaktionsablauf folgende Fermentreaktion - katalysiert durch die 6-P-Glucono-Lactonase - spaltet unter Wasseranlagerung den δ -Lactonring (CORI und LIPMANN, 1952; BRODIE und LIPMANN, 1955). Das entstandene 6-P-Gluconat wird von der 6-P-GD, wiederum unter Mithilfe von NADP^+ , umgesetzt (Abb. 1).

In einer Hyaloplasma-Präparation aus Säugetierzellen kann man erwarten, daß alle löslichen Fermente im physiologischen Verhältnis vorhanden sind. Die Aktivitätsmessung der G-6-PD ist daher dadurch kompliziert, daß G-6-PD und 6-P-GD das gleiche Co-Ferment benötigen. Außerdem ist das Produkt der G-6-PD, das entweder spontan oder durch die Glucono- δ -Lactonase hydrolysiert wird, das Substrat der 6-P-GD. Bei dem heute allgemein üblichen Verfahren wird - unter Benutzung einer Hyaloplasma-Fraktion - bei der Messung der G-6-PD-Aktivität mit dem optischen Test im Reaktionsansatz die Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ - also in Anwesenheit des Fermentes 6-P-GD - gemessen. Es ergibt sich daher die Frage, wie hoch der Anteil der 6-P-GD an der gemessenen NADP^+ -Reduktion ist. GLOCK und MCLEAN (1953) haben zur Lösung dieses Problems für die Aktivitätsmessung der G-6-PD in einer Fermentpräparation, die gleichzeitig 6-P-GD enthält, zwei Möglichkeiten vorgeschlagen:

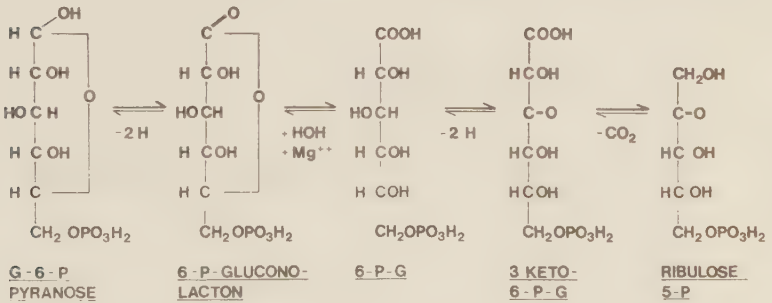
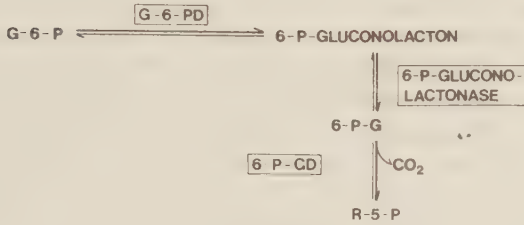
1. Die Aktivitäten der Fermente G-6-PD und 6-P-GD werden zusammen in einem Reaktionsansatz gemessen. Beide Substrate, G-6-P und 6-P-G, werden dem Medium im Überschuß zugesetzt.

Die Menge 6-P-G, die bei der Reaktion der G-6-PD und der Gluco-Lactonase entsteht, kann dann vernachlässigt werden, da die 6-P-GD im Versuchsansatz bereits mit Substrat gesättigt ist. Diese Methode wird im folgenden als GLOCK-MCLEAN-Methode I bezeichnet. Die NADP^+ -Konzentration darf die Aktivität beider Fermentreaktionen unter diesen Versuchsbedingungen nicht limitieren. Als Kriterium gilt, daß der Reaktionsablauf über 6 Minuten linear verläuft. In dieser Reaktion wird dann die Summe der Aktivitäten von G-6-PD und 6-P-GD bestimmt. In einem zweiten Reaktionsansatz muß anschließend die Aktivität der 6-P-GD - wieder unter optimalen Bedingungen - bestimmt werden. Wird die Aktivität der so gemessenen 6-P-GD von dem Resultat der Summen-Messung beider Fermente abgezogen, erhält man die annähernde Maximalgeschwindigkeit der G-6-PD.

II. Die Aktivität der G-6-PD wird in Gegenwart eines großen Überschußes 6-P-GD gemessen. Hierdurch soll das gebildete 6-P-G vollständig zu Ribulose-5-P umgesetzt werden. Geschwindigkeitsbestimmend ist dann die G-6-PD. Die Aktivität der G-6-PD ist unter diesen Bedingungen dann die Hälfte der gemessenen NADP^+ -Reduktion. In den folgenden Ausführungen wird diese Versuchsordnung als GLOCK-MCLEAN-Methode II bezeichnet.

Beide Methoden haben den Nachteil, daß sie nicht ohne weiteres eine Messung der Enzym-Kinetik der G-6-PD erlauben. So ist es weder möglich, genau den V_{max} -Wert, noch den K_m -Wert zu bestimmen. Die Angaben über die Enzym-Aktivität gelten nur für die Bedingungen der entsprechenden Reaktionsansätze. Ob der errechnete Wert die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht oder nicht oder ob eventuell sogar eine Substrathemmung resultiert, ist nicht mit Sicherheit zu ersehen. Auch das zweite charakteristische Merkmal eines Fermentes, die Michaeliskonstante, ist mit der Methode I gar nicht und mit der Methode II nur schwer zu ermitteln, da es sich um eine Mischreaktion handelt.

Abbildung 1: Oxidativer Teil des Pentose-Phosphat-Weges



1.2. Eigene Untersuchungen

Im Rahmen unserer Untersuchungen über den Stoffwechsel embryonalen Säugetiergewebes haben wir von allen untersuchten Fermenten des embryonalen Gewebes eine volle Enzym-Kinetik aufgenommen. Wir haben uns daher auch bemüht, von den Fermenten des oxidativen Teils des PPW Vmax- und km-Werte zu erhalten, um diese mit entsprechenden Werten von Organen erwachsener Gewebe zu vergleichen. Dies bietet im Falle der 6-P-GD keine besonderen Schwierigkeiten. Um entsprechende Daten auch für die G-6-PD zu erhalten, haben wir eine Reihe von Methoden auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht.

1.2.1 Material und Methoden

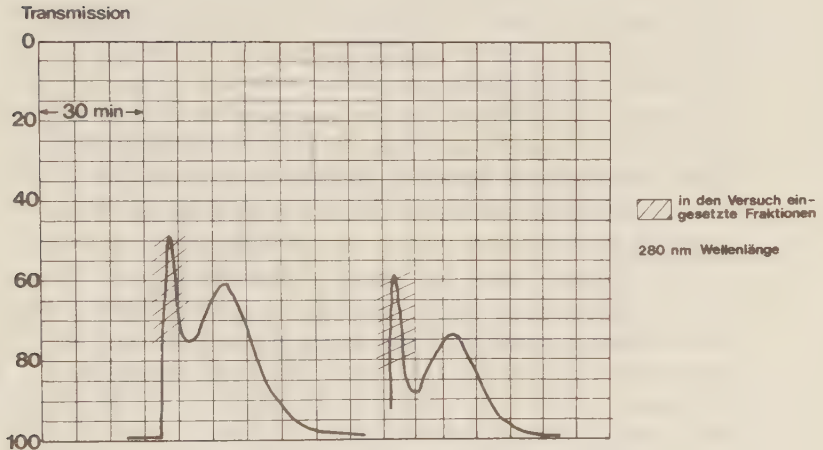
Für alle Versuche wurden WISTAR-Ratten der Stämme SW 64, SW 68 und SW 69 benutzt. Die Tiere wurden von der Firma Winkelmann, Borchsen-Kirchborchen, gekauft. Die Präparationen von Leber-Hyaloplasma wurden von erwachsenen, nicht-schwangeren Ratten erhalten. Die schwangeren Tiere wurden in einem Raum mit konstantem Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Hellperiode dauerte von 12.00 - 4.00 Uhr. Die Tiere wurden zwei Stunden gepaart (8.00 - 10.00 Uhr). Die Festsetzung des Embryoalters erfolgte so, daß die 24-Stunden-Periode vom Auffinden der Spermien bis 9.00 Uhr des folgenden Tages als Tag 0 bezeichnet wurde.

1.2.1.1. Fermentpräparation

.....

Nach Dekapitieren der Muttertiere am gewünschten Schwangerschaftstermin wurden die Embryonen herauspräpariert und sorgfältig von den Eihäuten befreit. Nach vorsichtigem Abtupfen des Fruchtwassers erfolgte das Homogenisieren in einem gekühlten 5-ml-Glashomogeni-

Abbildung 2: Sephadex-Fraktionierung von Embryo-Hyaloplasma



Die Abbildung zeigt zwei typische Kurven des Transmissions-Schreibers. Das Gerät ist an eine Photozelle für UV-Licht angeschlossen. Diese sitzt vor dem Tropfenzähler des Fraktionssammlers.

Der erste "Peak" zeigt die großmolekularen Bestandteile der Hyaloplasma-Präparation, der nächste, kleinere "Peak" die kleinemolekularen Bestandteile.

Für die Ferment-Kinetiken wurde der schraffierte Teil der Fraktion benutzt.

sator der Firma Braun, Melsungen. In einem Verhältnis Embryonen-Feuchtgewicht zu Homogenisationsmedium von 0,5 : 1 bis 2 : 1 wurde mit eiskalter Mg^{++} -Saccharose-Lösung ($MgCl_2$ 3 mM, Saccharose 0,32 M; 0,1 M Tris - pH 7,4) aufgefüllt und mit einem Teflon-Pistill bei 1.000 Umdrehungen/min. homogenisiert (= 10 x auf und ab). Anschließend wurden die korpuskulären Zellbestandteile in einer gekühlten Ultrazentrifuge (Spinco L 50) 90 Minuten bei 150.000 x g vom Hyaloplasma abgetrennt. Nach vorsichtigem Absaugen des flotierten Fettes von der Oberfläche wurde das klare Cytosol in ein vorgekühltes Becherglas dekantiert und in Eis gekühlt aufgehoben. Die Präparation der Embryonen aus den Uteri und die weitere Aufarbeitung wurden in einem Kühlraum bei 4° C durchgeführt.

Die Leber-Hyaloplasma-Fraktion wurde bis auf einen Zwischenschritt entsprechend durchgeführt. Nach dem Homogenisieren schloß sich erst eine Zentrifugation in einer MSE-18-Zentrifuge bei 10.000 x g für 10 Minuten an, um die Zelltrümmer und die häufig in reichlicher Menge vorhandenen Fette abzutrennen. Die Hyaloplasma-Fraktionen wurden entweder sofort für die Messung der Ferment-Kinetiken benutzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20° C aufbewahrt. Zur Abtrennung störender, kleinemolekularer Substanzen haben wir das Hyaloplasma häufig über eine Sephadex-Säule G 25 Coarse mit Kühlmantel der Firma PHARMACIA gegeben. Die Säule, die ca. 30 cm, bei einem Durchmesser von 3 cm, hoch gepackt war, wurde mit eiskaltem Phosphat-Puffer nach Sørensen, pH 7,4, oder mit eiskalter 1/15 M KCl-Lösung, die 8 ml 0,02 M $KHCO_3$ pro Liter mit einem pH-Wert von 7,4 enthält, equilibriert. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden 2-ml-Portionen in einer Kühlbox gesammelt. Die 8 bis 10 Portionen mit der höchsten Absorption im UV-Bereich (Abb. 2) wurden vereint und in 5-ml-Mengen sofort für die Kinetik-Messungen benutzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20° C aufbewahrt. Die schnell eingefrorenen und bei -20° C aufbewahrten Ferment-Präparationen zeigten bei der Messung der G-6-PD beziehungsweise 6-P-GD innerhalb einer Woche keinen Aktivitätsverlust.

1.2.1.2. Optimale Bedingungen

1.2.1.2.1. Bestimmung der G-6-PD

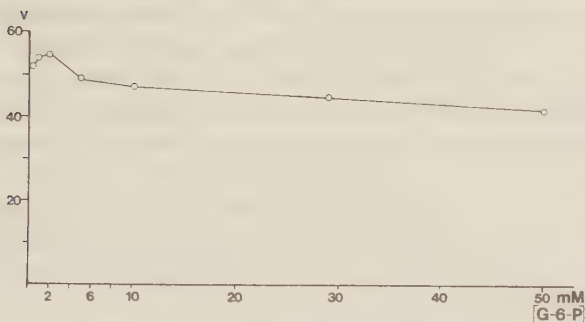
Für die G-6-PD aus Hefe und Säugetiergeweben nahm man lange Zeit an, daß NADP^+ den spezifischen Co-Faktor darstellt, z.B. GLOCK und MCLEAN (1953), KORNBERG und HORECKER (1955). LEVY (1961, 1963) konnte aber zeigen, daß die G-6-PD aus Säugetiergewebe diese absolute Spezifität für NADP^+ nicht besitzt. LEVY bestimmte die Michaelis-Konstante für NAD^+ für teilweise gereinigte G-6-PD der Milchdrüse und erhielt einen Wert, der drei Zehnerpotenzen größer war als der K_m -Wert, der von MCLEAN 1958 für NADP^+ beschrieben wurde. Bei unseren Messungen sollte nur NADP^+ in der Enzym-Kinetik benutzt und entsprechend variiert werden. Die von uns benutzte NADP^+ -Präparation der Firma Boehringer war zudem frei von NAD^+ . Die Angaben verschiedener Autoren über die K_m -Werte für NADP^+ bei der G-6-PD schwanken selbst bei gleichem Gewebe nicht unerheblich (NOLTMANN und KUBY, 1963). Die Ursache kann in der unterschiedlichen Reinheit der Präparation und an den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, die für die Aktivitätsmessung benutzt wurden, liegen. Als Variable kommen z.B. pH, Art der Puffer und benutzte Ionen-Konzentrationen infrage. GLOCK und MCLEAN (1953) zeigten, daß zweiwertige Kationen wie Mg^{++} , Ca^{++} und Mn^{++} die Aktivität auf 150 % der Werte steigern können, die ohne entsprechende Kationen gemessen werden. GLASER und BROWN (1955) zeigten darüber hinaus, daß die Michaelis-Konstanten für G-6-P und für NADP^+ bei pH 8 durch die Zugabe von Mg^{++} kleiner wurden. Die Maximalgeschwindigkeiten wurden nach seinen Angaben aber nicht verändert. LOWRY et al. (1961) fanden unter ähnlichen Bedingungen in bezug auf pH und Puffer - mit allerdings weit geringeren Substratkonzentrationen - viel kleinere Michaelis-Konstanten. Da die Reaktionsansätze für die Messung der G-6-PD in der Literatur recht unterschiedlich angegeben werden, haben wir für unsere Messungen mit ungereinigten Ferment-Präparationen die

optimalen Meßbedingungen bestimmt. Entsprechende Voruntersuchungen sind für embryonales Gewebe bisher nicht durchgeführt worden. Die Messungen wurden in 0,1 M Tris-HCl bei pH 7,4 durchgeführt. Als Meßgeräte standen ein Eppendorff-Photometer mit Kompensationsschreiber sowie ein Zeiss PM 4 und ein Leitz-Unicam-800-Doppelstrahlgerät - jeweils mit Registriereinrichtung - zur Verfügung. Diese Geräte waren mit Thermoblocken ausgestattet, so daß die Temperatur während des Meßvorganges konstant auf 25° C gehalten wurde. Außerdem wurden die Küvetten in einem Thermoblock vor der Messung auf 25° C gebracht, um eine Schwankung der Zimmertemperatur nicht in die Messung eingehen zu lassen. Gestartet wurde die Reaktion - wenn es nicht anders vermerkt ist - grundsätzlich mit dem Ferment.

Die Substanzen NADP^+ , G-6-P, 6-P-G wurden von der Firma Boehringer bezogen. Sie wurden in 0,1 M Tris-HCl gelöst und die Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Die NADP^+ -Konzentration wurde in einem Ansatz durch Zugabe von Hefe-6-P-GD (Boehringer) vor jeder Versuchsserie neu bestimmt.

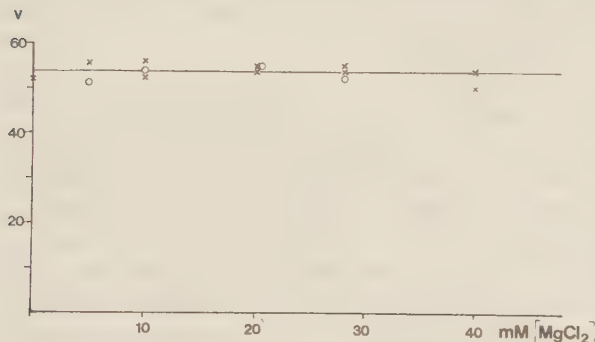
Für die Bestimmung der optimalen G-6-P-Konzentration im Reaktionsansatz zeigt die Abbildung 3 ein typisches Versuchsergebnis. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM MgCl_2 , 0,1 mM NADP^+ , 0,5 mM EDTA. Die Konzentration der G-6-P wurde zwischen 0,5 und 50 mM variiert. Als Puffer wurde 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 benutzt. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei einer G-6-P-Konzentration von 2 mM erreicht. Bei einer G-6-P-Konzentration von 50 mM wurden nur 75 % der optimalen Geschwindigkeit erreicht. Die optimale Konzentration für Rattenembryonen von 2 mM G-6-P stimmt gut mit Werten überein, die LÖHR und WALLER (1962) bei der Messung der Abhängigkeit von der G-6-P-Konzentration mit menschlichen Leberhomogenaten sowie mit Erythrocyten-Hämolysaten unter ähnlichen Meßbedingungen ermittelten. Auch die Reaktionsansätze von GLOCK und MCLEAN (1953), BRINSTER (1966) und SANWAL (1970) - um nur einige Beispiele zu nennen - enthalten 2 beziehungsweise 1 mM G-6-P.

Abbildung 3: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit
der G-6-PD von der G-6-P -Konzentration.



14-Tage-Embryonen, Hyaloplasma-Fraktion. Konstant blieb die Fermentmenge sowie die $MgCl_2$ -Konzentration.
 $v = \mu\text{mole} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Abbildung 4: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit
der G-6-PD von der Mg^{++} -Konzentration.



14-Tage-alte Ratten-Embryonen, Hyaloplasma-Präparation.
 $NADP^+$ 0,1 mM; G-6-P 1 mM; 0,1 M Tris pH 7,4
 x: G-6-PD mit 0,5 mM EDTA; o: G-6-PD ohne EDTA

Interessanter sind die in den Ansätzen genannten unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentrationen und die unterschiedlichen Aussagen über eine Aktivierung der G-6-PD durch dieses zweiwertige Kation. Die Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der $MgCl_2$ -Konzentration unter unseren Versuchsbedingungen und bei Verwendung von Hyaloplasma-Fractionen aus Rattenembryonen. Die Ansätze enthalten folgende Konzentrationen: G-6-P 1 mM, $NADP^+$ 0,1 mM und 0,5 mM EDTA. Die $MgCl_2$ -Konzentration wurde zwischen 0 und 50 mM variiert. Als Puffer diente wieder 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4. Wie aus der Abbildung 4 zu ersehen ist, wird unter diesen Bedingungen die Reaktionsgeschwindigkeit durch Mg^{++} nicht beeinflusst. Auch EDTA hat keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Die unter diesen Bedingungen gemessene Indifferenz der G-6-PD gegenüber Mg^{++} steht im Widerspruch zu den Messungen von GLOCK und MCLEAN (1953). Diese Autoren fanden - wie bereits erwähnt - eine Aktivierung der G-6-PD in Tris-Puffer durch 0,1 mM $MgCl_2$ auf 150 %. Auch LEVY (1963) berichtet von einer leichten Aktivitätszunahme bei der G-6-PD nach Zugabe von Mg^{++} . Er benutzte allerdings - im Gegensatz zu GLOCK und MCLEAN - ein von G-6-PD weitgehend gereinigtes Ferment. Auch LEVY's Messungen wurden in 0,1 M Tris-Puffer durchgeführt.

Einen interessanten Befund hat SANWAL (1970) mit einer G-6-PD-Präparation von E.coli erhoben, die er 170-fach angereichert hatte: Seine Messungen in 0,05 M Tris-HCl, pH 8, zeigen, daß dieses bakterielle Ferment gegenüber Mg^{++} und einer Anzahl Poly-Kationen - wie z.B. Spermidine, Spermine, Protamin oder Polyserin - mit einer fast fünffachen Aktivitätssteigerung reagiert. Da KORNBERG (1950) berichtete, daß die G-6-PD durch Mg^{++} nur in Glycylglycin-Puffer, nicht aber in verdünntem Phosphat-Puffer oder Tris-Puffer, aktiviert wird, sind die unterschiedlichen Ergebnisse vielleicht durch die unterschiedlichen Fermentpräparationen zu erklären. Zur Herstellung der Fermentpräparation benutzten die einzelnen Autoren nämlich recht verschiedene Lösungen. Es empfiehlt sich daher, bei der Benutzung

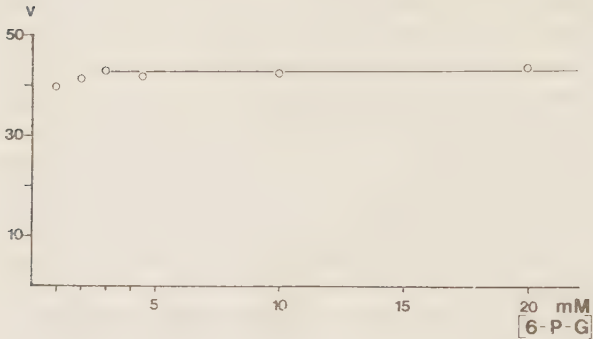
einer Fermentpräparation aus bisher nicht untersuchten Geweben die Eigenschaften der G-6-PD in bezug auf ein- oder zweiwertige Kationen zu überprüfen.

1.2.1.2.2. 6-P-GD --..--..--..--..--

Die 6-P-GD wird durch ihr Substrat 6-P-G auch in höheren Konzentrationen nicht gehemmt (Abb. 5). Unter diesen Meßbedingungen war eine 6-P-G-Konzentration von 2 mM im Versuchsansatz für die maximale Umsatzgeschwindigkeit ausreichend. HORECKER und SMYRNIOTIS berichteten (1951), daß hohe Substratkonzentrationen die 6-P-GD aus Hefe gegen die Hemmung durch Schwermetalle schützen können. Daher wurde die 6-P-G-Konzentration in unseren Versuchen nicht an der unteren Grenze gewählt.

Ähnlich unterschiedlich wie bei der G-6-PD sind die Literaturangaben in bezug auf die Aktivierung durch Mg^{++} -Ionen bei der 6-P-GD. HORECKER und SMYRNIOTIS (1951) berichten, daß die 6-P-GD - aus Hefe gereinigt - durch Glycylglycin-Puffer und Mg^{++} aktiviert wird. Der Aktivierungseffekt durch Glycylglycin-Puffer läßt sich auch mit anderen schwermetall-Ionen-blindenden Verbindungen wie Cystein erreichen. Die Autoren fanden, daß der aktivierende Effekt der Mg^{++} -Ionen sehr variabel ist. Er lag bei verschiedenen Präparationen zwischen 40 und 400 %. Der maximale Effekt wurde bei einer Konzentration von 5 mM $MgCl_2$ bestimmt. GLOCK und MCLEAN (1953) fanden in 0,01 M Tris-Puffer, pH 8,4, in Leber-Cytosol eine Aktivierung der 6-P-GD bei einer Konzentration von 100 mM $MgCl_2$ auf 120 %. PONTREMOLI et al. (1961) untersuchten einige kinetische Parameter der kristallinen Form der 6-P-GD aus *Candida utilis*. Diese Autoren fanden in Gegenwart von Mg^{++} einen kleineren K_m -Wert für 6-P-G, ohne daß sich der K_m -Wert für $NADP^+$ änderte. Bei unseren Versuchen - die Abbildung 6 zeigt ein Beispiel - fanden wir auch in 0,1 M Tris eine Aktivitätssteigerung der 6-P-GD durch Mg^{++} . Das Maximum der Aktivierung

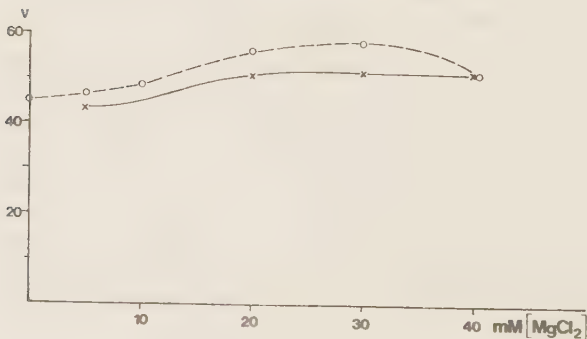
Abbildung 5: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit
der 6-P-GD von der 6-P-G-Konzentration.



Hyaloplasma-Fraktion 14-Tage-alter Rattenembryonen.

Ansatz: MgCl_2 20 mM; NADP^+ 0,1 mM; EDTA 0,5 mM. 6-P-G wurde variiert. $v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

Abbildung 6: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit
der 6-P-GD von der Mg^{++} -Konzentration.



Hyaloplasma-Fraktion 14-Tage-alter Rattenembryonen.

x 6-P-G 2 mM; EDTA 0,5 mM; NADP^+ 0,1 mM. o 6-P-G 2 mM; ohne EDTA; NADP^+ 0,1 mM
 $v = \mu\text{mole ADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

Tabelle 1: Verhältnis der Aktivitäten von G-6-PD zu 6-P-GD im Versuchsansatz

m μ mole NADPH ₂ x Ansatz ⁻¹ x min ⁻¹ (Vmax)							
	1	2	3		4	5	
	G-6-PD Methode I GLOCK/MCLEAN	G-6-PD direkt ohne Ferment-Zusatz %	G-6-PD + Hefe 6-P-GD %		6-P-GD Hyaloplasma	6-P-GD (Hyaloplasma) + Hefe 6-P-GD	6-P-GD (Hyaloplasma) 6-P-GD (Hefe)
			von 1)				
Embryo 13 Tage	4,9 ^x ± 0,1	5,6 ^x ± 0,1	114	118	6,5	6,5 + 41,6 = 48,1	1 : 9
Leber	5,6	6,2	110	122	24,4	24,4 + 208 = 232	1 : 42
Leber	6,5	6,9	106	112	22,7	22,7 + 104 = 126,7	1 : 19

Diese Werte sind bei dieser Versuchsreihe pro Ansatz und nicht wie sonst auf mg Protein bezogen. In jedem G-6-PD-Ansatz (Hyaloplasma-Fraktion) sind bereits konstante und bestimmbare 6-P-GD-Aktivitäten vorhanden. Außerdem wurde in einigen Versuchsansätzen handelsübliche Hefe-6-P-GD zugesetzt.

Benutzt wurden Hyaloplasma-Fraktionen nach Passage durch Sephadex-G-25-Säulen.

x = Mittelwerte aus 2 Versuchsserien.

Abbildung 7: NADP^+ -Reduktion durch G-6-PD in der Leber-Hyaloplasma-Fraktion weiblicher, nicht trächtiger Ratten nach Passage einer Sephadex-G-25-Säule und Zusatz verschiedener Mengen Hefe-6-P-GD.

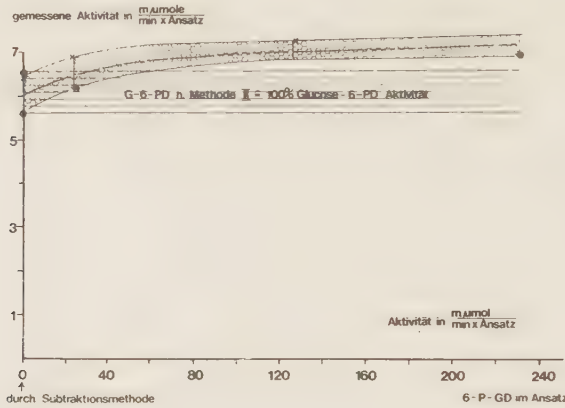
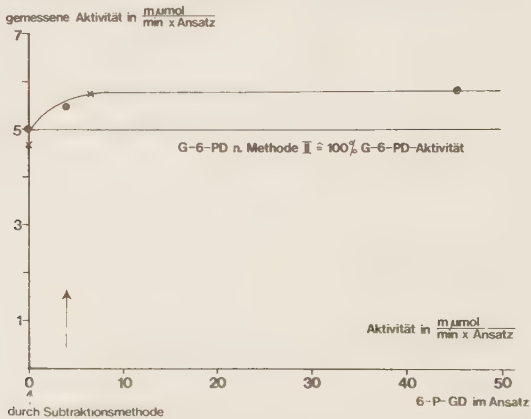


Abbildung 8: NADP^+ -Reduktion durch G-6-PD in der Hyaloplasma-Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen nach Passage durch eine Sephadex-G-25-Säule und Zusatz verschiedener Mengen Hefe-6-P-GD.



Zu Abb. 7 und 8: Zu erwarten wäre nach Zugabe von 6-P-GD eine Verdoppelung des nach der Subtraktionsmethode (GLOCK-MCLEAN I) erhaltenen Wertes. Der Pfeil bezeichnet den Wert der ohne Zugabe des käuflichen Fermentes (6-P-GD) - nur in Gegenwart der aus dem Hyaloplasma stammenden 6-P-GD - gemessen wurde.

Tabelle 2: Embryo-Hyaloplasma (Tag 14) nach Passage durch Sephadex-G-25-Säule

		Vmax = $\mu\text{mole NADPH} \cdot \text{H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg P}^A$				Mittelwerte	
						Vmax	$\frac{\text{km}}{\text{M}} \cdot \text{NADP}^+$
GLOCK/ MCLEAN- Methode I	6-P-G + G-6-P In einem Reaktionsansatz	62,3 ± 0,5	64,5 ± 1,1	68,1 ± 1,6	86,9 ± 0,8	70,5	5,7 · 10 ⁻⁶
	6-P-GD	31,7 ± 0,3	33,4 ± 0,4	40,2 ± 0,6	44,7 ± 0,7	37,5	5,6 · 10 ⁻⁶
	Differenz für G-6-PD	30,6	31,1	28	42,2	33	
GLOCK/ MCLEAN- Methode II	G-6-PD ^x	35,2 ± 0,3		34,2 ± 0,4	37,6 ± 1,2	35,7	7,1 · 10 ⁻⁶
	G-6-PD + 6-P-GD ^{xx}	67,5 ± 1,9	64,8 ± 1,4				1 · 10 ⁻⁵
	G-6-PD + 6-P-GD ^{xxx}		42,5 ± 0,8				7 · 10 ⁻⁶

Gegenüberstellung der nach verschiedenen Meßmethoden bestimmten Vmax-Werte der G-6-PD. Die untereinander stehenden Vmax-Werte wurden mit einer Fermentpräparation erhalten.

^x Hyaloplasma ohne Fermentzusatz

^{xx} 6-P-GD aus Leberhyaloplasma, gereinigt

^{xxx} 6-P-GD, im Handel erhältliches Hefeferment

Tabelle 3: Embryo-Hyaloplasma (Tag 12) nach Passage durch Sephadex-G-25-Säule

		$\mu\text{mole NADP}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1} (\text{Vmax})$				Mittelwerte	
						Vmax	$\frac{\text{km}}{\mu\text{M NADP}^+}$
GLOCK/ MCLEAN- Methode I	6-P-G + G-6-P in einem Reaktionsansatz	87,5 $\pm 0,6$	77,6 $\pm 0,5$	88,4 $\pm 0,7$		84,5 $\pm 6,0$	7,0 $\pm 1,0$
	6-P-GD	53,2 $\pm 0,3$	44,8 $\pm 0,3$	57,0 $\pm 0,7$		51,6 $\pm 6,2$	5,8 $\pm 1,1$
	Differenz für G-6-PD	34,3	32,8	31,4		32,9 $\pm 1,6$	
	G-6-PD ^x	39,4 $\pm 0,4$	33,3 $\pm 0,2$	39,0 $\pm 0,6$	31,4 $\pm 0,8$	35,8 $\pm 4,0$	6,2 $\pm 0,6$
GLOCK/ MCLEAN- Methode II	G-6-PD + 6-P-GD ^{xx}	62,0 $\pm 0,7$	62,1 $\pm 1,4$			62,05	14,0 $\pm 1,0$
	G-6-PD + 6-P-GD ^{xxx}	36,6 $\pm 0,9$				36,6 $\pm 0,9$	12,0 $\pm 2,0$

Vergleich der verschiedenen Meßmethoden der G-6-PD.

^x Hyaloplasma ohne Fermentzusätze

^{xx} 6-P-GD aus Leberplasma, gereinigt

^{xxx} 6-P-GD, im Handel erhältliches Hefeferment

Tabelle 4: G-6-PD-Bestimmung aus der Leber-Hyaloplasma-Fraktion nicht-schwangerer Tiere

Versuchs- serie	Methode I (GLOCK/MCLEAN)						Methode II (GLOCK/MCLEAN)							
	A				B		C		D					
	G-6-P + 6-P-G in einem Ansatz	km (μ M)	Vmax	km (μ M)	Vmax	Rest für G-6-PD	G-6-PD ^x km (μ M)	Vmax	% von A	G-6-PD ^{xx} km (μ M)	Vmax	% von A	G-6-PD ^{xxx} km (μ M)	Vmax
I	8,9 $\pm 0,7$	135,1 $\pm 2,4$	7,4 $\pm 1,5$	111,3 $\pm 5,1$	<u>23,8</u>	9,3 $\pm 0,3$	<u>42,3</u> <u>$\pm 0,4$</u>	183	13 ± 3	48,8 <u>$\pm 3,5$</u>	200	12 $\pm 0,3$	<u>47,9</u> <u>$\pm 0,4$</u>	200
II	7,4 $\pm 1,0$	135,0 $\pm 4,6$	7,2 $\pm 1,0$	109,1 $\pm 3,0$	<u>25,9</u>	9,0 $\pm 1,0$	<u>46,1</u> <u>$\pm 1,2$</u>	178	15 ± 2	57,6 <u>$\pm 1,8$</u>	210			

Die Vmax-Werte sind Ergebnisse vollständiger Kinetiken. Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten sind angegeben als:
 $m \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$.

Es sind die Ergebnisse von zwei verschiedenen Versuchsreihen wiedergegeben (I bzw. II).

Bei der Verwendung der Hyaloplasma-Fraktion ohne vorherige Trennung über eine Sephadex-G-25-Säule - Gegensatz zu
 Tabelle 5 - reagieren etwa 80 % des gebildeten 6-P-G weiter (B).

x Hyaloplasma ohne Fermentzusätze

xx Hyaloplasma mit 6-P-GD-Zusatz (aus Leberhyaloplasma gereinigt)

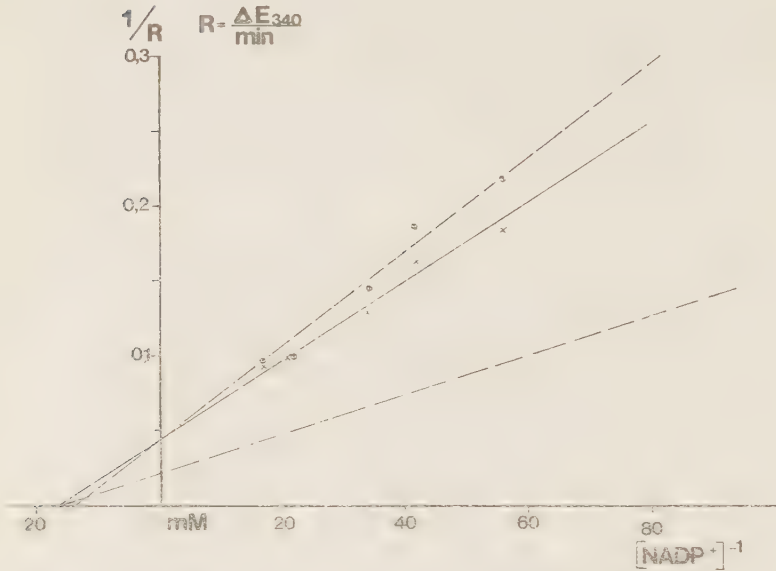
xxx Hyaloplasma mit Hefe-6-P-GD-Zusatz

zu denen von GLOCK und MCLEAN (1953) mit Leber-6-P-GD zu klären, wurde eine 6-P-GD aus Lebern erwachsener Tiere nach den Angaben dieser Autoren präpariert. Die relativ einfach durchzuführende Ammonsulfat-Fällung und anschließende Dialyse ergibt eine G-6-PD-arme, hochaktive 6-P-GD. Wurde nun diese 6-P-GD aus Leber im Überschuß, d.h. mit einem noch gerade zu vernachlässigenden G-6-PD-Gehalt, zu dem Test-Ansatz zugegeben, so ergaben sich Werte, die genau doppelt so hoch waren wie die zu erwartende G-6-PD-Aktivität (Tabellen 2 und 3). Diese Ergebnisse wurden mit Ferment-Präparationen nach Passage durch eine Sephadex-G-25-Säule erhalten.

Versuchsreihen mit "rohen Leberfermenten" - also ohne Säulen-Behandlung - zeigen ein anderes Bild (Tabelle 4). Auch hier wurde mit der GLOCK-MCLEAN-Methode I die G-6-PD-Aktivität bestimmt. Aber schon bei einfacher Messung nach Methode II, d.h. ohne Zugabe von 6-P-GD, wurden für die G-6-PD $\approx 180\%$ NADP⁺-Reduktion gegenüber Methode I gemessen. Bei Zugabe von 6-P-GD aus Hefe bzw. aus Leberzellen wurden in diesem Falle 200 %, d.h. 100 % Zuwachs, durch das Weiterreagieren des entstandenen 6-P-G gefunden. Die in den Tabellen 2 und 3 wiedergegebenen Resultate haben gezeigt, daß bei der Messung der G-6-PD im Hyaloplasma nach Passage durch eine Sephadex-G-25-Säule bei Zusatz von käuflicher Hefe-6-P-GD kaum ein Zuwachs, bei Zugabe von selbst präparierter 6-P-GD aus Leber jedoch etwa 200 % der zu erwartenden G-6-PD-Aktivität gemessen wurde. Als Erklärung für das verschiedene Verhalten der käuflichen Hefe-6-P-GD und der selber präparierten Leber-6-P-GD könnte der unterschiedliche Lactonase-Gehalt dienen. Es ist zu vermuten, daß - mit der Präparation aus Leber - Lactonase in den Ansatz gebracht wird, durch das gereinigte Ferment aus Hefe hingegen nicht.

Die Halbwertszeit des 6-P-Glucono- δ -Lactons bei pH 7,4 beträgt ca. 1,5 min. (HORECKER und SMYRNIOTIS, 1953). Diese Autoren konnten mit gereinigter G-6-PD und 6-P-GD zeigen, daß der limitierende Schritt die Spaltung des Lactonringes ist.

Abbildung 9: NADP^+ -Reduktion durch Hefe G-6-PD
mit und ohne Zusatz von 6-P-GD.



x = G-6-PD

o = G-6-PD + 6-P-GD, G-6-P als Substrat

----- erwarteter Umsatz bei vollständigem Weiterreagieren
des 6-P-Glucono- δ -Lactons.

G-6-PD 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Protein; 6-P-GD 20 $\mu\text{g/ml}$ Protein.

Tabelle 5: NADP⁺-Reduktion ohne und mit Zusatz
von käuflicher Hefe-6-P-GD zum Versuchsansatz.

Leber-Hyaloplasma

SW 69, Tiere nicht gravide

Ferment nach Passage durch Sephadex-G-25-Säule

(Pi-Puffer, $\frac{1}{15}$ M, pH 7,4)

G - 6 - P D				
ø 6-P-GD-Zusatz		+ 6-P-GD (Hefe)		Zuwachs in %
km · 10 ⁻⁵ M	Vmax $\frac{\mu\text{mole}}{\text{min} \cdot \text{mg Pr}}$	km · 10 ⁻⁵ M	Vmax $\frac{\mu\text{mole}}{\text{min} \cdot \text{mg Pr}}$	
1,2 ± 0,1	27,4	1,4 ± 0,1	28,3 ± 0,6	103 %
1,0 ± 0,3	28,4	1,3	29,8	105 %
1,9 ± 0,3	23,2 ± 1,4	3,4 ± 0,6	26,8 ± 2,6	115 %
2,0 ± 0,2	26,0 ± 1,1	1,5 ± 0,1	28,8 ± 0,1	110 %
n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4
	Mittelwerte	1,9 ± 1,0	28,4 ± 1,3	

Zitat:

"Bei Anwesenheit beider Fermente werden 2 Mole NADP^+ für jedes Mol Glucose reduziert. Das erste Äquivalent wird sehr viel schneller reduziert als das zweite, obgleich die 6-P-G-Aktivität mehr als zweimal größer ist, als die der G-6-PD".

Ein ähnlicher Schluß kann aus eigenen Versuchen gezogen werden, deren Ergebnisse aus Abbildung 9 zu ersehen sind: Mit einem käuflichen G-6-PD-Präparat aus Hefe wurde eine Kinetik aufgenommen. Dann wurde ein ca. 400-facher Überschuß (Aktivität) an 6-P-GD aus Hefe zugesetzt. Mit G-6-P als Substrat konnte keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit registriert werden. Bei der kurzen Registrierzeit hat offenbar die nicht enzymatische Hydrolyse nicht ausgereicht, um eine meßbare Menge 6-P-G aus dem Lacton zu bilden. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei niedrigen NADP^+ -Konzentrationen eher etwas langsamer.

1.2.3. Aktivität der G-6-PD im Hyaloplasma ohne Zusatz von 6-P-GD zum Versuchsansatz

Die in den Tabellen 1 und 5 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß selbst bei der Messung der G-6-PD im Hyaloplasma der Leberzellen erwachsener Tiere - d.h. unter Bedingungen, bei denen 6-P-GD ca. dreimal aktiver ist als die G-6-PD - ohne Zugabe von 6-P-GD offenbar nur ca. 10 % des entstandenen 6-P-G weiter reagiert. Für diese Experimente wurden Hyaloplasma-Präparationen nach Passage durch eine Sephadex-G-25-Säule benutzt. Wird eine Hyaloplasma-Präparation aus Leber ohne Passage durch Sephadex benutzt, so werden (Tab. 4) auch ohne Zugabe von externer 6-P-GD etwa 180 % der zu erwartenden G-6-PD-Aktivität gemessen. Die Benutzung einer solchen Präparation empfiehlt sich jedoch deshalb nicht, weil mit dieser Präparation unkontrollierte Mengen von Substraten und Co-Faktoren dem Reaktionsansatz zugefügt werden können.

Ähnlich sieht die Rechnung auch bei der Messung der G-6-PD mit

einer Hyaloplasma-Präparation 12- bzw. 14-Tage-alter Ratten-embryonen aus, die durch eine Säule gegeben wurden (Tab. 2 und 3). In einer größeren Zahl von Versuchsserien wurden für embryonales Gewebe Werte zwischen 110 und 150 % der zu erwartenden Aktivität ermittelt. Allerdings war bei der Messung der Aktivität im embryonalen Gewebe - im Gegensatz zu Leber - auch kein vollständiges Weiterreagieren des gebildeten 6-P-Gluconolactons zu beobachten, wenn auf die Säulen-Behandlung verzichtet wurde. Wenn der Unterschied im Verhalten vor und nach Säulen-Behandlung bei Lebergewebe auf eine Verminderung der Aktivität der Glucono- δ -Lactonase bezogen wird, müßte man aus den Ergebnissen der Versuche mit embryonalem Gewebe schließen, daß entweder der Lactonase-Gehalt im Embryo bereits primär geringer ist oder daß er durch die Präparation - oder Verdünnung - unter einen kritischen Wert vermindert wird. Bei Abwesenheit oder geringerer Aktivität der Lactonase könnte die langsame Hydrolysierung des 6-P-Gluconolactons unter Kinetik-Bedingungen der limitierende Faktor für die zweite Reaktion sein. Der genau doppelt so hohe NADP⁺-Verbrauch wäre dann nicht so sehr auf den Zusatz der 6-P-GD sondern - besonders bei Ferment-Präparationen, die über eine Säule gegeben wurden - auf den vermehrten Lactonase-Gehalt der 6-P-GD-Präparation aus Leber zurückzuführen.

Die Ergebnisse zeigen auch, daß Resultate und Versuchsbedingungen, die für ein Gewebe erarbeitet wurden, bei der Messung der Aktivität der G-6-PD nicht unbedingt für ein anderes Gewebe Gültigkeit besitzen.

Eine ideale Lösung wäre vorhanden, wenn die 6-P-GD aus der Hyaloplasma-Präparation entfernt werden könnte. Hierbei wird aber - auch bei sorgfältiger Reinigung der G-6-PD - die Aktivität dieses Fermentes sicher vermindert, und die Frage des Bezugssystems wird kaum lösbar.

1963 gab LEVY an, daß die Aktivität der G-6-PD im Hyaloplasma auch gemessen werden könne, indem - bei Verwendung eines Dop-

Abbildung 10: Auswertung einer Versuchsserie mit der
Hyaloplasma-Fraktion 13-Tage-alter Ratten-
embryonen zur Bestimmung der Kinetik der
G-6-PD nach GLOCK-MCLEAN-Methode I.

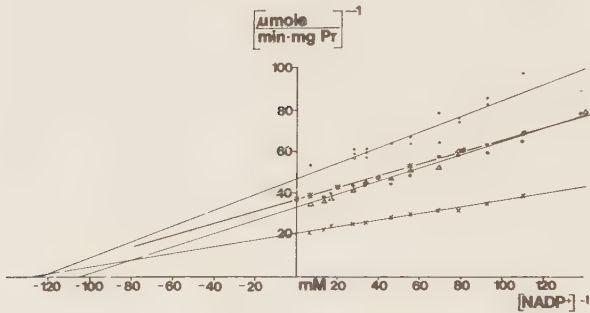
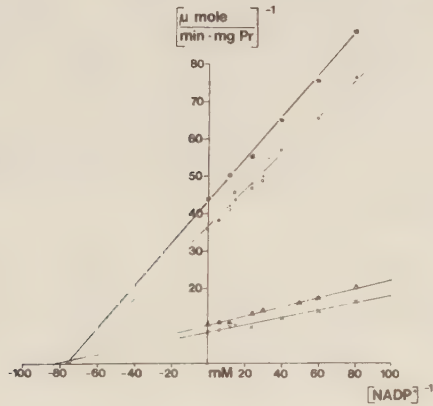


Abbildung 11: Auswertung einer Versuchsserie mit Leber-Hyaloplasma zur Bestimmung der Kinetik der G-6-PD nach der GLOCK-MCLEAN-Methode 1.



Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die doppelt reziproken Darstellungen der Versuchsreihen mit der Hyaloplasma-Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen bzw. einer Leberpräparation. Die Cytosole wurden über eine Sephadex-Säule G 25 "Coarse" gegeben.

$$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

o = G-6-PD

Δ = G-6-PD + 6-P-GD (Hefe)

• = 6-P-GD

x = 6-P-GD + G-6-PD (beide Substrate)

* = (G-6-PD + 6-P-GD) - 6-P-GD (rechnerisch)

pelstrahlgerätes - automatisch die Aktivität der 6-P-GD von der Summe subtrahiert wird. Zugrunde gelegt wurde die GLOCK-MCLEAN-Methode I:

Er benutzte zwei Küvetten mit unterschiedlichen Reaktionsansätzen. Die eine Küvette enthielt nur G-6-P und die andere beide Substrate. Die NADP^+ -Konzentration war in beiden Küvetten gleich. Nach dem Starten beider Reaktionen registrierte er die Differenz an reduziertem $\text{NADPH} + \text{H}^+$ in beiden Küvetten. Er benutzte diese Technik nur für die G-6-PD-Aktivitäts-Bestimmung im Verlauf seiner G-6-PD-Reinigung. Eine Kinetik hat er mit dieser Methode nicht geschrieben.

Wir haben versucht, ob sich ein solches Verfahren auch für kinetische Untersuchungen der G-6-PD-Aktivität eignet. Anhand einer Meßreihe mit der Hyaloplasma-Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen zeigt die Abbildung 10 in der doppelt reziproken Darstellung die Messung der G-6-PD. Die Experimente wurden in diesem Falle so durchgeführt, daß in einem Einstrahlgerät jede Reaktion allein gemessen wurde. Gegenübergestellt sind:

1. die Messung der G-6-PD mit (Δ) und ohne (o) Hefefermentzugabe - die Meßpunkte beider Methoden liegen hier auf einer Geraden -
2. die Messung bei Anwesenheit von G-6-P und 6-P-G (x) in einem Reaktionsansatz (Summen-Messung nach GLOCK-MCLEAN-Methode I)
3. Messung der 6-P-GD (•)
4. eine resultierende Gerade, deren eingetragene Punkte nach Abzug der 6-P-GD-Aktivität von der entsprechenden Zwei-Substrat-Messung (G-6-P und 6-P-G, beide in Sättigungs-Konzentrationen) erhalten werden (x).

Analoge Versuchsserien, die mit Leber-Hyaloplasma durchgeführt wurden, zeigen, daß auch mit der Präparation aus diesem Organ zufriedenstellende Resultate erhalten wurden (Abb. 11). Wir folgern aus diesen Ergebnissen, daß es möglich ist, nach der Methode LEVY bzw. GLOCK-MCLEAN I reproduzierbare kinetische Untersuchungen durchzuführen.

1.2.4. Messung der G-6-PD-Aktivität in Gegenwart von 6-ANADP

Die bessere, ja fast ideale Messung bietet sich mit dem kompetitiven Hemmstoff 6-ANADP an. 6-ANADP konkurriert mit dem NADP^+ am Rezeptor des Fermentes 6-P-GD um die Bindungsstelle. 6-ANADP kann nicht als Wasserstoff-Akzeptor dienen (BRUNNEMANN et al., 1964). Es hat sich nun durch Hemmkinetiken erwiesen (siehe Abschnitt 2), daß die Fermente G-6-PD und 6-P-GD in sehr unterschiedlichem Ausmaß durch 6-ANADP gehemmt werden. Die K_i -Werte unterscheiden sich um ca. zwei Zehnerpotenzen. Dadurch ist es möglich, die 6-P-GD fast völlig zu hemmen, ohne die G-6-PD wesentlich in ihrer Aktivität zu beeinträchtigen. DIXON und WEBB (1958) haben den Hemmungsgrad, das heißt das Verhältnis von gehemmter (v_i) und ungehemmter (v) Umsatzgeschwindigkeit bei gleicher Substratkonzentration mit α bezeichnet.

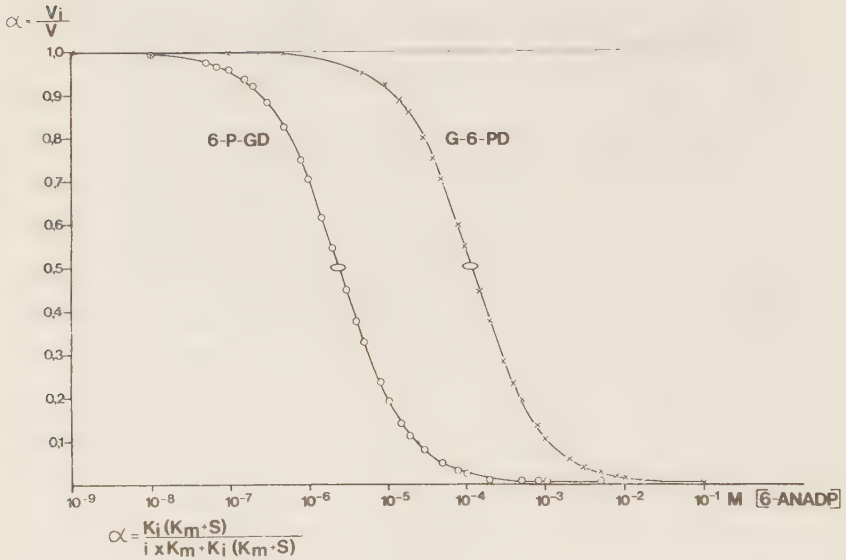
$$\alpha = \frac{v_i}{v}$$

Die Autoren haben dann bei dem kompetitiven Hemmungstyp für den Hemmungsgrad die Beziehung aufgestellt:

$$\alpha = \frac{K_i(K_m + s)}{1 + K_m + K_i(K_m + s)}$$

Da K_i und K_m Konstanten darstellen, bleiben nur s und i als Variable. Aus der Substratkonzentration und der Hemmstoffkonzentration läßt sich nun mit Hilfe dieser Formel der jeweilige Hemmungsgrad errechnen. Mit einer programmierbaren Rechenmaschine WANG 370 haben wir derartige Berechnungen durchgeführt. Die Resultate sind in den Abbildungen 12 und 13 sowie in der Tabelle 6 wiedergegeben. Die prozentualen Aktivitäten zeigt die Abbildung 12 für eine Substrat-Konzentration von 50 μM . Trotz der zwei Zehnerpotenzen Unterschied in den K_i -Werten gelingt es nicht, die 6-P-GD bei weitgehend erhaltener Aktivität der G-6-PD vollständig zu hemmen. Die sich entsprechenden Hemmungen sind aus der Tabelle 6 zu entnehmen.

Abbildung 12: Abhängigkeit der Aktivität der Fermente G-6-PD und 6-P-GD von der Hemmstoff-Konzentration bei einer Substrat-Konzentration (50 μ M).



Die Abbildung zeigt den unterschiedlichen Hemmungsgrad bzw. die Aktivität der G-6-PD und 6-P-GD bei steigenden Hemmstoff-Konzentrationen. Für diese Abbildung liegt die Formel aus DIXON und WEBB (1958) zugrunde: $\frac{v_i}{v} = \frac{K_i(K_m + s)}{i \cdot K_m + K_i(K_m + s)}$

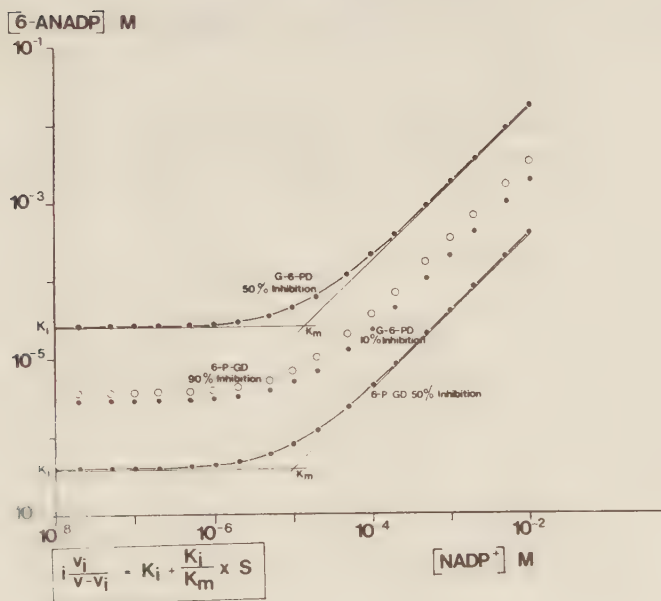
Die Berechnung erfolgte mit einer programmierten WANG-370-Rechenmaschine.

Für die G-6-PD lauten die in die Formel eingesetzten Parameter:

$K_m = 14 \mu\text{M NADP}^+$; $K_i = 26 \mu\text{M 6-ANADP}$ und für die 6-P-GD:

$K_m = 10 \mu\text{M NADP}^+$; $K_i = 0,4 \mu\text{M 6-ANADP}$.

Abbildung 13: Konzentrationspaare (i und s) bei konstantem Hemmungsgrad



Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit von "i" und "s" bei einem kompetitiven Hemmungstyp. Für 50 % und 90 % bzw. 10 % Hemmung werden die Kurven der G-6-PD und 6-P-GD dargestellt. Die für die Rechnung benutzten Konstanten sind für die G-6-PD: $K_m = 14 \mu\text{M NADP}^+$; $K_i = 26 \mu\text{M 6-ANADP}$. für die 6-P-GD: $K_m = 10 \mu\text{M NADP}^+$; $K_i = 0,4 \mu\text{M 6-ANADP}$.

Tabelle 6

Verhältnis der Aktivitäten von G-6-PD und 6-P-GD,
die in Gegenwart von 6-ANADP erreicht wurden.

Für die Berechnung benutzt (13-Tage-Embryo):

K_m (NADP⁺) G-6-PD: 14 μ M

K_m (NADP⁺) 6-P-GD: 10 μ M

K_i (6-ANADP) G-6-PD: 26 μ M

K_i (6-ANADP) 6-P-GD: 0.4 μ M

Bei einer Hemmung der

6-P-GD

verbleibt eine Aktivität

der G-6-PD

um	auf	von
4	96	99.9
68	32	96
77	23	94
81	19	92
84	16	90
93	7	80
95	5	70
97	3	60
98	2	54
99	1	37

Die für die entsprechenden Hemmungen notwendigen Hemmstoff-
 bzw. Substrat-Konzentrationen können aus den Abbildungen 12
 und 13 abgelesen werden.

Für unser Problem ist es interessant, daß mit dem Hemmstoff 6-ANADP z.B. die 6-P-GD zu 90 % gehemmt werden kann bei nur 16 % Hemmung der G-6-PD. Da es sich - wie im Abschnitt 2 dargelegt - um eine streng kompetitive Hemmung handelt, kann jedem gewünschten Prozentsatz der Hemmung ein Paar - s und i - zugeordnet werden.

Um nicht für alle verschiedenen Substratkonzentrationen alle Kurvenpaare einzeichnen zu müssen, wurde eine weitere Abbildungsform gewählt: Mit Hilfe der Gleichung (DIXON und WEBB, 1958)

$$i \cdot \frac{\alpha}{1 - \alpha} = KI + \frac{KI}{Km} \cdot s$$

lassen sich für verschiedene Hemmungsgrade (α) die Abhängigkeit von Substrat (NADP^+) und Hemmstoff (6-ANADP) darstellen. In einem doppelt logarithmischen Maßstab wurden die einem Hemmungsgrad entsprechenden Kurven für i und s aufgezeichnet (Abb. 13). In dieser Abbildung sind die Kurven für 50 % Hemmung der G-6-PD und 6-P-GD bzw. 90 % für 6-P-GD und 10 % Hemmung für die G-6-PD dargestellt. Es ergeben sich Hyperbelausschnitte, deren eine Tangente bei der entsprechenden Kurve für 50 % Hemmung die i-Achse im Punkte KI schneidet und deren Asymptote die Tangente im Punkte Km (s-Achse abzulesen) schneiden muß, da die entsprechenden Werte in die Formel eingesetzt wurden.

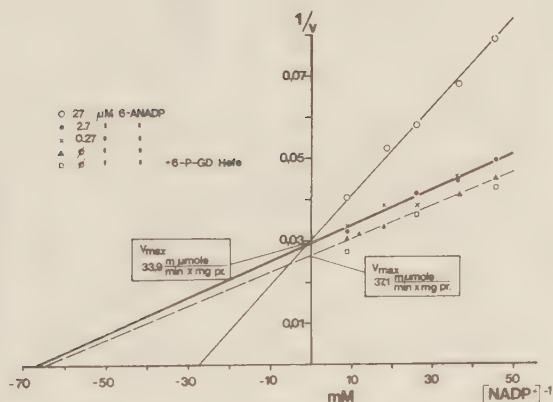
Nach diesen theoretischen Überlegungen und nach diesen Vorversuchen wurde der Hemmstoff 6-ANADP dazu benutzt, um die im embryonalen Gewebe gemessenen Aktivitäten der G-6-PD zu überprüfen und zu verifizieren. Bei einer streng kompetitiven Hemmung ändert sich der Vmax-Wert nicht. In der doppelt reziproken Darstellung schneiden sich alle Kurven, die mit verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen erhalten wurden, auf der y-Achse (im $1/V_{\text{max}}$ -Punkt). Trägt unter den Versuchsbedingungen die 6-P-GD zur Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ bei - wir vermuten bei der benutzten Fermentpräparation aus Embryonen etwa 10 % - so müßte man fordern, daß der Schnittpunkt mit der y-Achse sich den Kurven entsprechend im doppelt

reziproken System mit zunehmender Hemmstoff-Konzentration zu niedrigeren Werten verschiebt (nach "oben") und sich die Aktivitätskurven nach weitgehender Ausschaltung der 6-P-GD-Reaktion in einem Punkte "drehen". Wie Abbildung 14 und die Tabelle 7 zeigen, kann ein solches Verhalten tatsächlich demonstriert werden. Auf diese Weise erhalten wir den "wahren" V_{max} -Wert der G-6-PD, der gut mit Daten übereinstimmt, die mit der GLOCK-MCLEAN-Methode I (unter "Sättigungsbedingungen") erhalten wurden. Es wäre wünschenswert gewesen, die Versuche mit noch höheren 6-ANADP-Konzentrationen durchzuführen. Leider stand der Hemmstoff in nur sehr begrenzter Menge zur Verfügung.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die kleine Menge 6-Phospho- δ -Gluconolacton, die mit 6-P-GD weiter reagiert, durchaus variabel ist. Dies konnte auch bei der hier geschilderten Art von Experimenten bestätigt werden: In dem in Abbildung 15 wiedergegebenen Versuch, der unter recht ähnlichen Bedingungen, wie in Abbildung 14 geschildert, mit Leber-Hyaloplasma (nach Säulen-Fraktionierung) durchgeführt wurde, wird eine Veränderung des V_{max} -Wertes nicht beobachtet. Offenbar wird hier auch ohne Hemmstoff praktisch nur die G-6-PD gemessen.

Wir haben versucht, die mit dem Hemmstoff 6-ANADP gewonnenen Daten auch zur Bestätigung des vorher erhaltenen K_m -Wertes der G-6-PD im embryonalen Gewebe zu benutzen, da ein Einfluß der 6-P-GD auf die Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von 6-ANADP weitgehend ausgeschlossen werden kann. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 16 wiedergegeben. Hier wurden alle gemessenen K_p -Werte aus den Hemmkinetiken der G-6-PD mit 6-ANADP gegen die Hemmstoff-Konzentration i doppelt logarithmisch aufgetragen. Für die Kinetiken wurden die Hyaloplasma-Fractionen 13-Tage-alter Rattenembryonen verschiedener Präparationen benutzt. Die Formel aus DIXON und WEBB (1958) zeigt die Abhängigkeit des K_m -Wertes von der Hemmstoff-Konzentration i . Der K_m -Wert wird bei Anwesenheit eines kompetitiven Hemmstoffs mit K_p bezeichnet:

Abbildung 14: Hemmung der G-6-PD 13-Tage-alter Rattenembryonen



Die Abbildung zeigt die Hemmung der G-6-PD 13-Tage-alter Rattenembryonen. Die Hyaloplasma-Fraktion wurde nicht über eine Sephadex-Säule gereinigt. Die Geraden mit dem höheren Hemmstoffgehalt schneiden die Ordinate bei einem kleineren V_{max} -Wert. Die Differenz der beiden V_{max} -Werte kann als Aktivitätsanteil der 6-P-GD in der ungehemmten Reaktion angesehen werden. Der K_{m} -Wert wird durch 0,27 bzw. 2,7 μM 6-ANADP nicht verändert und kann als "wahrer" K_{m} -Wert angesehen werden.

Tabelle 7: Berechnete prozentuale Hemmung und gemessene Reaktionsgeschwindigkeiten der G-6-PD in Gegenwart von 6-ANADP

Embryo 13 Tage, Hyaloplasma-Fraktion, ohne Säulen-Fraktionierung

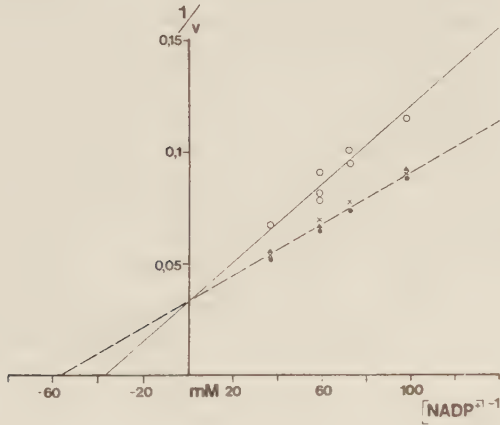
	erwartete	aus den gemessenen Vmax-Werten errechnete ^x	gemessene ^{xxx}	
Hemmstoff-Konzentration	Aktivität bei 50 µM NADP ⁺	Aktivität bei 50 µM NADP ⁺	$\frac{V_{max}}{\text{min} \times \text{mg Pfr}}$	"km" (kp)
ohne Hemmstoff	G-6-PD (6-P-GD) 100 (100)	28,4 108	37,1 ± 1,1	1,5 · 10 ⁻⁵ ± 0,1
0,27 µM	G-6-PD (6-P-GD) 100 (90)	26,2 100	34 ± 2,5	1,5 · 10 ⁻⁵ ± 0,4
2,7 µM	G-6-PD (6-P-GD) 97 (47)	26,2 100	35 ± 0,9	1,7 · 10 ⁻⁵ ± 0,2
27 µM	G-6-PD (6-P-GD) 82 (8)	19,8 75,5	34 ± 3,8	3,6 · 10 ⁻⁵ ± 1,0

^x nach der Formel $v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{s}{K_m}}$ nach Dixon und Webb 1958 aus den gemessenen Vmax-Werten berechnet

^{xx} G-6-P als Substrat bei Anwesenheit beider Fermente in der Hyaloplasma-Fraktion

^{xxx} Die Messung bei 0,27 µM 6-ANADP wurde als 100 % gesetzt (siehe auch Text).

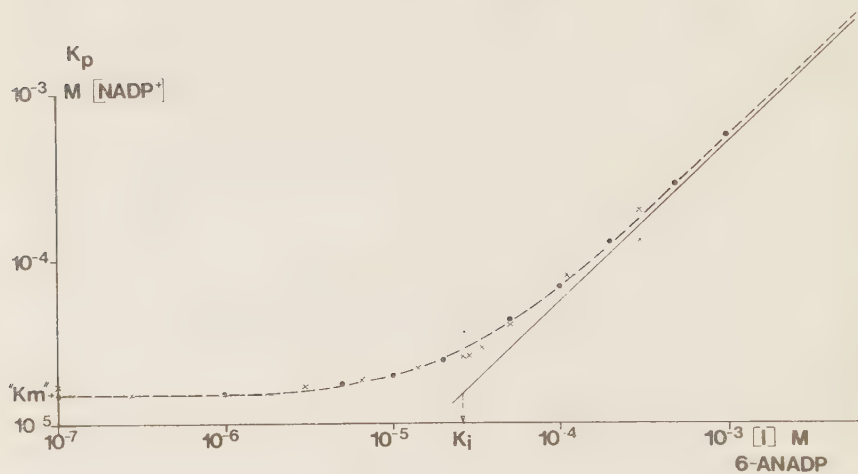
Abbildung 15: Hemmkinetik der G-6-PD in dem Leber-Cytosol
nicht schwangerer Ratten.



Die Abbildung zeigt, daß die V_{max} -Werte der G-6-PD bei gehemmter und ungehemmter Kinetik gleich bleiben. Die Hyaloplasma-Fraktion aus Leber wurde über eine Sephadex-Säule G 25 gereinigt. Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN pH 7,4 wurde zum Equilibrieren der Säule benutzt.

- ▲ = ohne Hemmstoff
- x = 0,18 μM 6-ANADP
- = 1,8 μM 6-ANADP
- o = 18 μM 6-ANADP

Abbildung 16: Graphische Darstellung der Abhängigkeit der gemessenen Kp-Werte von der Hemmstoff-Konzentration



--- = errechnete Werte (K_m angenommen aus Versuchen ohne Hemmstoff) nach der Formel $K_p = K_m(1 + \frac{I}{K_i})$

x = gemessene K_p -Werte in Gegenwart verschiedener 6-ANADP-Konzentrationen.

1.2.5.1. Versuche mit Cu^{++} -Ionen

Eigene in-vitro-Versuche mit Hyaloplasma-Präparationen aus 12-Tage-alten Rattenembryonen konnten die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Fermente bestätigen und weiterhin zeigen, daß keine wesentlichen Mengen des bei der G-6-PD-Reaktion entstandenen 6-P-G unter den benutzten Bedingungen weiter reagierten. Abweichend von den anderen Messungen, bei denen die Reaktion mit Ferment gestartet wurde, mußten die Reaktionen bei Anwesenheit von Cu^{++} mit einem Substrat gestartet werden. Nach kurzer Inkubationszeit des vollständigen Ansatzes (ohne 6-P-G) stellte sich zwischen den Cu^{++} -Ionen und der 6-P-GD ein Gleichgewicht ein. Nach dem Starten mit 6-P-G ergibt sich dann ein linearer Reaktionsverlauf. (Unter den sonst üblichen Bedingungen ist nach Zugabe des Fermentes eine rasche Aktivitätsabnahme zu erkennen, bis das Gleichgewicht sich eingestellt hat.)

Die Tabelle 8 zeigt eine Versuchsreihe mit einer Hyaloplasma-Fraktion 12-Tage-alter Rattenembryonen. Die Fermente wurden über eine Sephadex-Säule G 25 von kleinmolekularen Substanzen befreit. In den Versuchsserien wurden die Fermente G-6-PD und 6-P-GD unter zwei verschiedenen Bedingungen gemessen:

1. Aktivitätsbestimmung unter optimalen Bedingungen, d.h. mit MgCl_2 . In diesen Ansatz wurden $0.05 - 1 \text{ mM } \text{Cu}^{++}$ als CuSO_4 zugegeben.
2. Aktivitätsbestimmung ohne MgCl_2 . Die Mg^{++} -Ionen wurden weggelassen, um eine mögliche Konkurrenz mit den Kupfer-Ionen auszuschließen.

Wie aus den Abbildungen 17 und 18 (auch Tab. 9) hervorgeht, ist die Hemmung durch Cu^{++} unter beiden Bedingungen gleich. Die G-6-PD wird in dem untersuchten Cu^{++} -Konzentrationsbereich nicht nennenswert gehemmt. Die 6-P-GD ist bei einer Cu^{++} -Konzentration von $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ zu etwa 50 % und bei $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ zu praktisch

Tabelle 8: Zusammenstellung der Ergebnisse von Versuchen mit Cu⁺⁺

Embryo 12 Tage, Hayloplasma-Fraktion nach Säulenfraktionierung							
Datum Präparation / Geschrieben	MgCl ₂ mM	CuSO ₄ M	G-6-PD ohne Ferment- zusätze gemessen	6-P-G	Σ der Aktivität mit beiden Substraten	G-6-PD + 6-P-GD ^{xx} GLOCK-MCLEAN- Methode II	G-6-PD GLOCK-MCLEAN- Methode I
22.2./22.2.	10 mM	Ø	33,3 ± 0,2	44,8 ± 0,3	77,6 ± 0,5	31,0	32,8
22.2./23.2.	10 mM	Ø	39,4 ± 0,4	53,0 ± 0,7	87,5 ± 0,5		34,5
28.2./28.2.	10 mM	Ø	39,0 ± 0,6	57,0 ± 0,6	88,4 ± 0,7	31,5	31,4
28.2./29.2.	10 mM	Ø	31,4 ± 0,8				
22.2./23.2.	10 mM	1 · 10 ⁻³	33,5 ± 1,8	< 2,5 ^x			
28.2./29.2.	10 mM	1 · 10 ⁻³	33,4 ± 1,9				
22.2./23.2.	Ø	1 · 10 ⁻³	30,2 ± 0,4	< 2,5 ^x			
28.2./29.2.	Ø	1 · 10 ⁻³	36,0 ± 0,1				
28.2./29.2.	10 mM	1 · 10 ⁻⁴	43,6 ± 2,2	23,0 ± 1,0			
28.2./29.2.	Ø	1 · 10 ⁻⁴	37,0 ± 0,3	24,5 ± 0,3			
22.2./23.2.	10 mM	5 · 10 ⁻⁵	37,3 ± 0,1				
22.2./23.2.	Ø	5 · 10 ⁻⁵	38,4 ± 0,5	23,4 ± 0,8			
28.2./29.2.	10 mM	1 · 10 ⁻⁵	35,7 ± 2,0	54,2 ± 6,0			
28.2./29.2.	Ø	1 · 10 ⁻⁵	33,8 ± 1,3	44,0 ± 3,1			

Die Versuchsergebnisse mit 0,05 - 1 mM CuSO₄ und die Ergebnisse nach den GLOCK-MCLEAN-Methoden I und II sind einander gegenübergestellt. Es handelt sich um V_{max}-Werte, die mit einer programmierbaren WANG-Rechenmaschine aus den kinetischen Daten berechnet wurden.

V_{max} = $\mu\text{mole x min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$
^x keine NADP⁺-Abhängigkeit meßbar.
^{xx} aus Leberpräpariert

Die Versuchsergebnisse mit 0,05 - 1 mM CuSO₄ und die Ergebnisse nach den GLOCK-MCLEAN-Methoden I und II sind einander gegenübergestellt.

Es handelt sich um Vmax-Werte, die mit einer programmierbaren WANG-Rechenmaschine aus den kinetischen Daten berechnet wurden.

Vmax = $\mu\text{mole} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$

^x keine NADP⁺-Abhängigkeit meßbar.

^{xx} aus Leberpräpariert

Abbildung 17: Unterschiedliche Empfindlichkeit der G-6-PD und der 6-P-GD gegenüber Cu^{++} (ohne MgCl_2 bzw. EDTA im Hemmsatz)

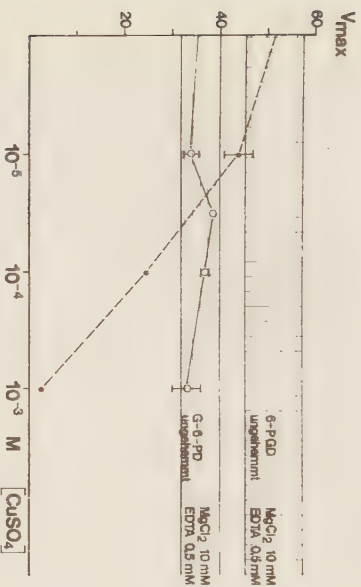
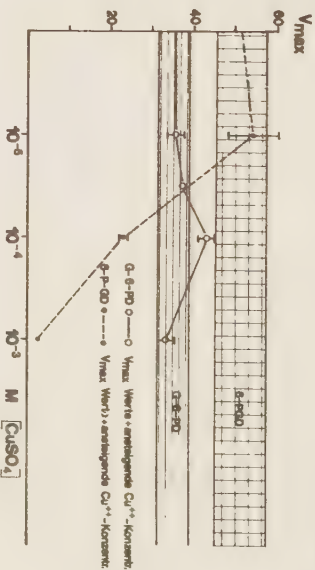


Abbildung 18: Unterschiedliche Empfindlichkeit der G-6-PD und der 6-P-GD gegenüber Cu^{++} (MgCl_2 10 mM und EDTA 0,5 mM auch im Hemmsatz)



Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die Hemmung der G-6-PD und 6-P-GD 12-Tage-alter Rattenembryonen. Die ermittelten V_{max} -Werte in $\mu\text{mol NADPH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ wurden in Abhängigkeit von der CuSO_4 -Konzentration aufgetragen. Die G-6-PD wurde ohne Zusatz von 6-P-GD gemessen.

- G-6-PD : V_{max} -Wert mit Streuung aus vier Messungen
- G-6-PD o-o : V_{max} -Werte in Gegenwart steigender Cu^{++} -Konzentrationen
- 6-P-GD im Raster: V_{max} -Wert mit Streuung aus vier Messungen
- 6-P-GD --- : V_{max} -Werte in Gegenwart steigender Cu^{++} -Konzentrationen

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchen mit Cu⁺⁺

14-Tage-Embryonen,

Hyaloplasma-Fraktion nach Sephadex-G-25-Säulen-Passage

	Ø MgCl ₂	Ø MgCl ₂ 1 • 10 ⁻⁴ M CuSO ₄	10 mM MgCl ₂ 1 • 10 ⁻⁴ M CuSO ₄
G-6-PD	33,4	39,4	40,4
6-P-GD	33,6	17,9	17,4
Σ der Aktivität mit beiden Substraten	53,6	57,0	52,2
G-6-PD (GLOCK-MCLEAN Methode 1)	30,0	39,1	34,8

Orientierend mit der Cytosol-Fraktion 14-Tage-alter Rattenembryonen durchgeführte Messungen zeigen eine gleiche Empfindlichkeit der 6-P-GD gegenüber CuSO₄.

Alle Werte für 0,1 mM NADP⁺, v in $\mu\text{mole NADPH} \cdot \text{H}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$

Tabelle 10: Einfluß von Zn⁺⁺ auf G-6-PD und 6-P-GD von Ratten-Embryonen

13-Tage-Embryonen, Sephadex-Säule G 25 mit $\frac{1}{15}$ M KCl-Puffer, pH 7,4

	Ø Zn ⁺⁺	1 • 10 ⁻⁵ M Zn ⁺⁺	1 • 10 ⁻⁴ M Zn ⁺⁺	1 • 10 ⁻³ M Zn ⁺⁺
6-P-GD	40,0	45,5	24,4	12,8
	100 %	110 %	61 %	32 %
G-6-PD	29,8	27,8	32,2	29,4
	100 %	93 %	108 %	100 %

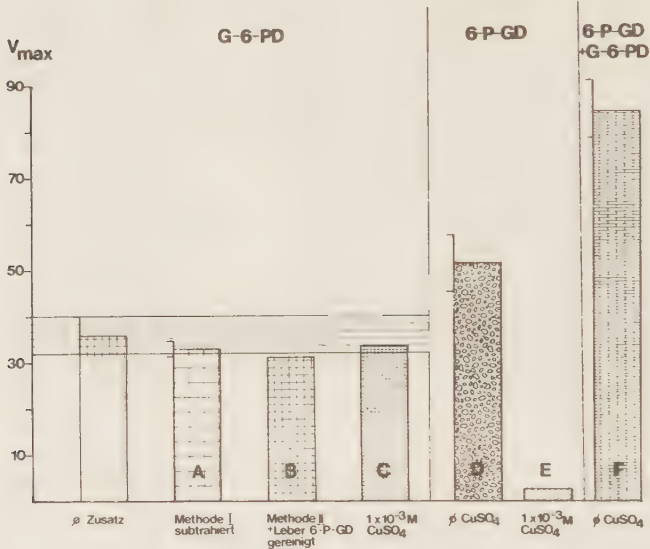
14-Tage-Embryonen, Sephadex-Säule G 25 mit $\frac{1}{15}$ M KCl-Puffer, pH 7,4

	Ø Zn ⁺⁺	5 • 10 ⁻⁵ M Zn ⁺⁺	1 • 10 ⁻⁴ M Zn ⁺⁺	5 • 10 ⁻⁴ M Zn ⁺⁺
6-P-GD	33,3	23,2	19,1	6,6
	100 %	68 %	58,5 %	20 %

Die Werte sind v-Werte bei 0,05 mM NADP⁺ in $\frac{\mu\text{mole}}{\text{min} \times \text{mg Pr}}$

Ansatz: MgCl₂ 10 mM, G-6-P 2 mM, 6-P-G 2,5 mM, Zn-Acetat in unterschiedlichen Konzentrationen, TPN 0,05 mM, Gesamtvolumen 1,0 ml, in 0,1 mM Tris

Abbildung 19: Bestimmung der G-6-PD-Aktivität 12-Tage-alter Rattenembryonen unter verschiedenen Meßbedingungen.



Quer verlaufender Raster: Maximalgeschwindigkeit der G-6-PD, unter optimalen Bedingungen ohne Zusatz von 6-P-GD gemessen. Die Säulen A und B stehen für Methode I und II (nach GLOCK und MCLEAN) und die Säule C für die Aktivität der G-6-PD bei Anwesenheit von $1 \cdot 10^{-3} M CuSO_4$. Die Säulen D und E zeigen zum Vergleich das Verhalten der 6-P-GD-Aktivität gegenüber Cu^{++} . F gibt die maximale Umsatzgeschwindigkeit in Gegenwart beider Substrate - G-6-P und 6-P-G - wieder. Die Umsatzgeschwindigkeit ist jeweils $\mu mole NADPH + H^+ \times mg Protein^{-1} \times min^{-1}$. Für die Messungen wurde eine Hyaloplasma-Präparation benutzt, die über eine Sephadex-Säule G 25 gereinigt wurde. Als Puffer für die Säule diente $\frac{1}{15} M KCl$ -Lösung.

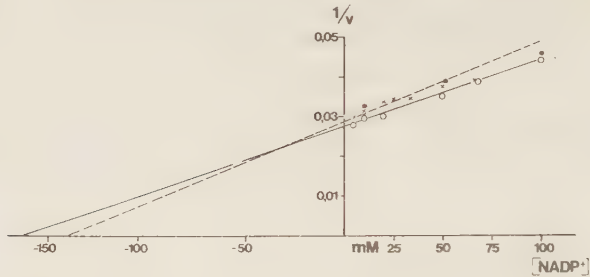
100 % gehemmt. Die Abbildung 19 zeigt die maximale Umsatzgeschwindigkeit der G-6-PD, die mit Hilfe verschiedener, beschriebener Methoden bestimmt wurde. Hier wurden die GLOCK-MCLEAN-Methoden I und II, die Daten, die ohne Ferment-Zusatz erhalten wurden, sowie die Werte in Gegenwart des Hemmstoffes Cu^{++} (1 mM) gegenübergestellt. Auffällig ist die gute Übereinstimmung der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten.

1.2.5.2. Versuche mit Zn^{++} -Ionen

.....

Zn^{++} -Ionen wurden als Zinkacetat dem Reaktionsansatz zugesetzt. Versuche mit Hyaloplasma-Fraktionen 13- beziehungsweise 14-Tage-alter Rattenembryonen, die über eine Sephadex-Säule G 25 gegeben wurden, zeigen, daß die 6-P-GD gegenüber Zn^{++} weniger empfindlich ist als gegenüber Cu^{++} . In der Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ M Zn^{++} im Reaktionsansatz ist die Reaktionsgeschwindigkeit noch 20 bis 32 % der ungehemmten Geschwindigkeit. Für eine vollständige Hemmung der 6-P-GD sind so hohe Zn^{++} -Konzentrationen notwendig, daß sich diese Metall-Ionen für eine - durch die 6-P-GD unbeeinflusste - Messung der Kinetik der G-6-PD nicht eignen. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen die LINEWEAVER-BURK-Darstellungen der Kinetiken der G-6-PD und der 6-P-GD bei Anwesenheit von Zn^{++} . Ein klar definierbarer Hemm-Typ läßt sich - besonders bei hohen Hemmstoff-Konzentrationen - nicht erkennen.

Abbildung 20: G-6-PD 13-Tage-alter Rattenembryonen mit und ohne Zn-Acetat-Zusatz zum Reaktionsansatz.



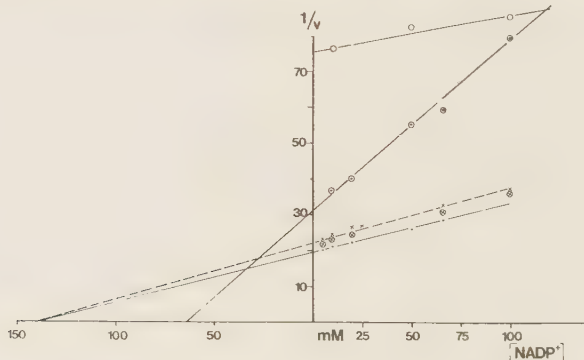
Die Abbildung zeigt den Hemmversuch der G-6-PD 13-Tage-alter Rattenembryonen mit Zn-Acetat. Die Hyaloplasma-Fraktion wurde über eine Sephadex-Säule G 25 gegeben. Als Puffer für die Fermentreinigung diente 1/15 M KCl pH 7,4.

x = ohne Zn^{++} ; o = 1×10^{-4} M Zn^{++} ; * = 1×10^{-3} M Zn^{++}

Ansatz: $MgCl_2$ 10 mM; G-6-P 2 mM; $NADP^+$ variiert 0,2 - 0,01 mM; Tris-HCl 0,1 M pH 7,4; keine 6-P-GD-Zugabe.

$v = \mu\text{mole } NADPH + H^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Abbildung 21: Hemmung der 6-P-GD 13-Tage-alter Rattenembryonen durch Zn^{++} .



Die Abbildung gibt die Hemmung der 6-P-GD durch Zn^{++} wieder. Es wurde die gleiche Hyaloplasma-Präparation wie in Abbildung 20 benutzt.

⊗ und x = ohne Zn^{++} ; * = 1×10^{-5} M Zn^{++} ; ⊙ = 1×10^{-4} M Zn^{++} ; o = 1×10^{-3} M Zn^{++}

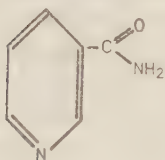
Ansatz: $MgCl_2$ 10 mM; 6-P-G 2,5 mM; $NADP^+$ variiert 0,2 - 0,01 mM; Tris-HCl-Puffer 0,1 M pH 7,4.

$v = \mu\text{mole } NADPH + H^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

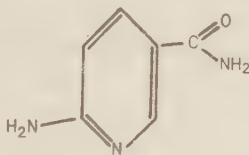
2. Einfluß des Antivitamins 6-AN auf einige Stoffwechselvorgänge von Rattenembryonen.

2.1. Vorbemerkung

6-AN ist eine strukturanaloge Verbindung des Nicotinsäure-Amids.



Nicotinamid



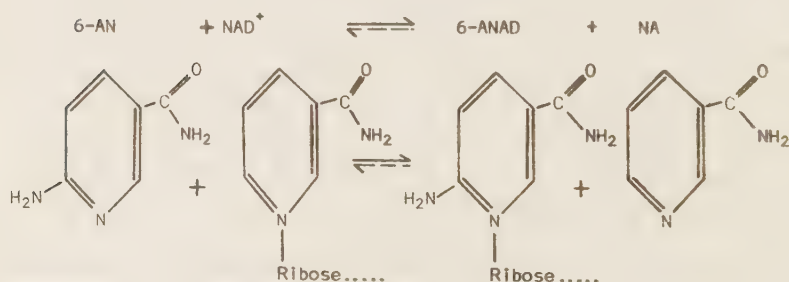
6-Aminonicotinamid

Die Autoren JOHNSON und MCCOLL (1955, 1956) konnten zeigen, daß Vergiftungssymptome nach Gabe von 6-AN durch vorherige oder gleichzeitige Gabe von Nicotinamid, Nicotinsäure und Tryptophan vermindert oder sogar aufgehoben werden. Zum Beispiel wird die LD₅₀ für 6-AN bei Mäusen durch 250 mg/kg Tryptophan verdoppelt. Diese Autoren konnten das 6-AN-Analoge des NAD⁺ chromatographisch und spectrographisch in Leber- und Nierengewebe sowie in wachsendem WALKER-Carcinom 256 bei Mäusen nachweisen. Im Rahmen unserer Untersuchungen haben wir uns besonders für die embryotoxischen Wirkungen des 6-AN interessiert. MURPHY et al. (1957) führten ausführliche Untersuchungen mit teratogenen Substanzen an Hühner- und Rattenembryonen durch. Sie fanden bei mit 6-AN behandelten Muttertieren - je nach dem Zeitpunkt der Gabe während der Schwangerschaft zwischen Tag 10 und 12 - bei einer einmaligen 6-AN-Gabe eine verschiedene LD₅₀, die zwischen 8 und 15 mg/kg für die Rattenembryonen lag. Die überlebenden Foeten zeigten - neben einer Retardierung in Größe und Gewicht - Skelettmißbildungen.

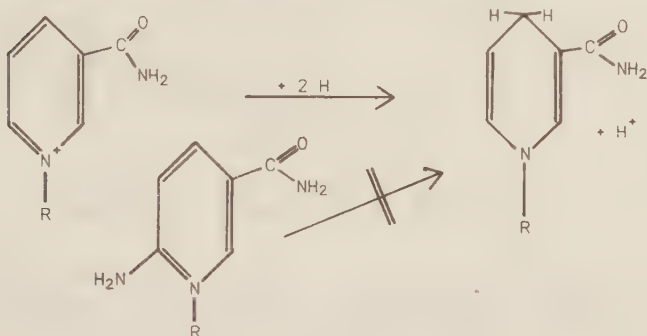
Eine Reihe von Autoren hat das Auftreten von Gaumenspalten bei Mäuseembryonen (z.B. PINSKY und FRASER, 1960; GOLDSTEIN et al., 1963) und

Rattenembryonen (z.B. CHAMBERLAIN, 1966) nach Behandlung der Muttertiere mit 6-AN untersucht. Gaumenspalten sind - besonders bei Mäusen - ein sehr empfindlicher Indikator für teratogene Wirkungen. Wie bei allen teratogenen Substanzen zeigt auch 6-AN eine Phasen-Spezifität der Wirkung. 6-AN mußte zu einem bestimmten Zeitpunkt - bei Ratten Tag 15, bei Mäusen Tag 13.1/2 - gegeben werden, um 100 % Gaumenspalten zu erzeugen. Der Gewichtsverlust der Muttertiere nach 6-AN-Behandlung ist für die Entstehung der Gaumenspalten nach Untersuchungen von CHAMBERLAIN offenbar nicht ausreichend. Unbehandelte Muttertiere, die 7 - 8 Tage in der kritischen Phase des Gaumenschlusses hungerten - und einen größeren Gewichtsverlust hatten - brachten normale Junge hervor (CHAMBERLAIN, 1966). 6-AN hat aber auch schon in geringen Dosen von 5 - 10 mg/kg bei erwachsenen Tieren eine toxische Wirkung. Beschrieben sind vor allem Störungen des Zentralnervensystems in Form von schlaffen Lähmungen der Skelettmuskulatur (COPER und HERKEN, 1963; HERKEN, 1968) und Temperatursenkung (BRUNNEMANN und COPER, 1963; COPER et al., 1971).

Um etwas über den Wirkungsmechanismus der teratogenen Wirkung des 6-AN zu erfahren, mußten in-vitro-Versuchsanordnungen mit herangezogen werden. JOHNSON und MCCOLL (1956) berichteten, daß aus einem Reaktionsansatz - der NAD^+ -Glycohydrolase, NAD und 6-AN enthielt - 6-ANAD isoliert werden konnte. BRUNNEMANN et al. (1964) stellten ein System vor, mit dem 6-ANAD und 6-ANADP in reiner kristalliner Form synthetisiert werden kann.

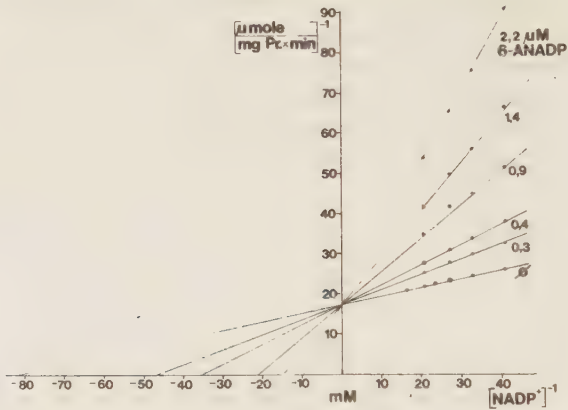


Mit dieser Methode konnten nun größere Mengen 6-ANAD gewonnen werden, und diese Substanz wurde von den Autoren in in-vitro-Versuchen auf ihre Hydrierbarkeit untersucht. Die Versuche mit Dehydrogenasen (z.B. Alkohol- oder Malat-Dehydrogenase), die NAD^+ als Co-Faktor benötigen, zeigten, daß 6-ANAD auch nach langer Reaktionszeit keinen Wasserstoff aufnehmen kann.



Die Aminogruppe in Position 6 verhindert offenbar die Ausbildung der chinoiden Form des Pyridinringes. Eine wesentliche Hemmung der NAD^+ -abhängigen Dehydrogenase durch 6-ANAD konnte nicht gefunden werden. COPER und Neubert (1964) synthetisierten 6-ANADP und fanden bei einigen NADP^+ -abhängigen Dehydrogenasen eine kompetitive Hemmung durch den Antimetaboliten. Für die G-6-PD aus Hefe ermittelten sie einen K_i -Wert für 6-ANADP von 20 - 30 μM . Eigene Hemmkinetiken mit 6-ANADP und Fermenten aus embryonalem Gewebe sind im anschließenden Kapitel dargestellt.

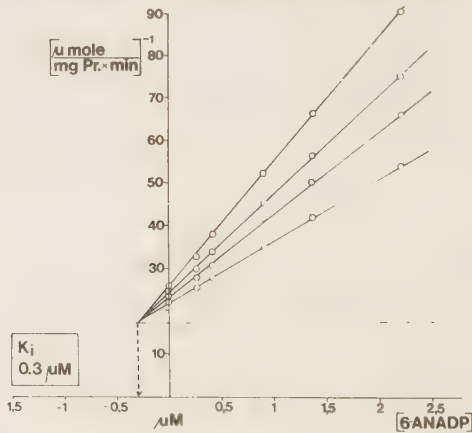
Abbildung 22: Hemmung der 6-P-GD durch 6-ANADP in der doppelt reziproken Darstellung



Die doppelt reziproke Darstellung zeigt, daß 6-ANADP die 6-P-GD im Hyalo plasma 13-Tage-alter Rattenembryonen kompetitiv hemmt. Die Schnittpunkte der Geraden - die durch die Hemmung steiler verlaufen - mit der Abszisse ergeben die negativen, reziproken K_i -Werte zu den entsprechenden Hemmstoff-Konzentrationen.

$$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}.$$

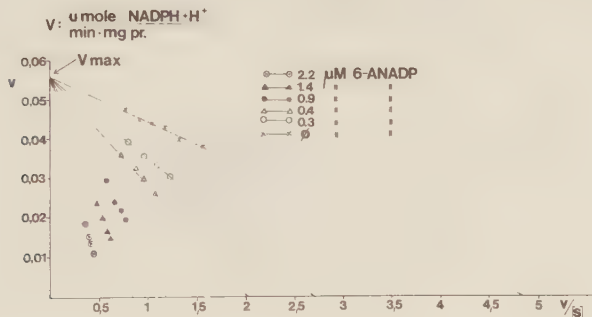
Abbildung 23: DIXON-Diagramm der Hemmung der 6-P-GD durch 6-ANADP



Die graphische Darstellung nach DIXON zeigt den K_i -Wert für 6-ANADP der 6-P-GD in der Hyalo plasma-Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen.

$$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}.$$

Abbildung 24: Hemmung der 6-P-GD durch 6-ANADP in der Darstellung v gegen v/s

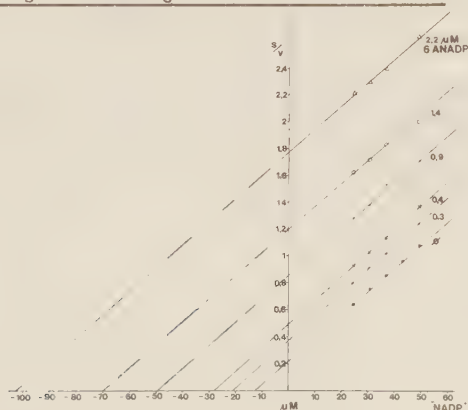


Das Diagramm v gegen v/s zeigt, daß die Hemmung der 6-P-GD im Cytosol 13-Tage-alter Rattenembryonen durch 6-ANADP kompetitiv ist, da die Ordinate in einem Punkt geschnitten wird. Die Maximalgeschwindigkeit wird durch den Hemmstoff nicht verändert.

$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$; $s = \text{mM NADP}^+$

Hemmstoffkonzentrationen (6-ANADP): $\circ$ 2,2 μM ; Δ 1,4 μM ; $\bullet$ 0,9 μM ; $\triangle$ 0,4 μM ; $\square$ 0,3 μM ; $\times$ ohne Hemmstoff.

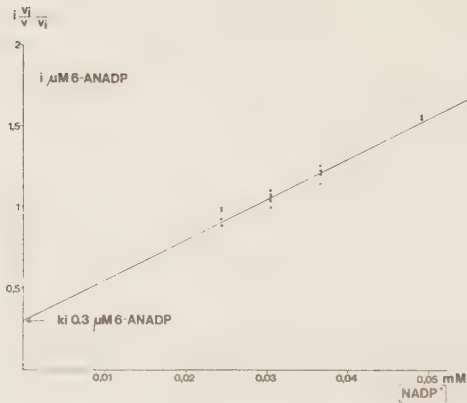
Abbildung 25: Hemmung der 6-P-GD durch 6-ANADP



Der parallele Kurvenverlauf in dieser Darstellung ist typisch für eine kompetitive Hemmung. Der Schnittpunkt der Geraden - die aus den Meßpunkten der ungehemmten Reaktion gebildet wird - mit der Abszisse zeigt den K_m -Wert. Die anderen Schnittpunkte ergeben die zu den jeweiligen Hemmstoff-Konzentrationen gehörenden K_p -Werte.

$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$; $s = \mu\text{M}$

Abbildung 26: Darstellung der Hemmung der 6-P-GD durch
6-ANADP nach HUNTER und DOWNS



Graphische Darstellung nach HUNTER und DOWNS (aus DIXON und WEBB 1958).

Aufgetragen ist $i \frac{\alpha}{1 - \alpha}$ gegen die Substrat-Konzentration $NADP^+$. Hierbei ist i die Hemmstoff-Konzentration in μM ; α der Hemmungsgrad $\frac{v_i}{v}$. Aus diesem Diagramm ist sowohl der Hemmungstyp als auch der K_i -Wert zu entnehmen. Die Punkte müssen auf einer Geraden liegen. Die Steilheit der Kurve ist: $\frac{K_i}{K_m}$.

Abbildung 27: Mathematische Berechnung von Km und Vmax
nach der Methode von WILKINSON (1961).

ENZYM: 6-P-GD

ORGAN: 13 Tage-Embr.

DATE: 6.11.69

1.	0.7000	Gesamtvolumen
2.	0.0000	Faktor für Umrechnung von % Ausschlag auf $\Delta E/\text{min}$
3.	1.0000	Enzymverdünnung
4.	6.2000	Extinktionskoeffizient
5.	5.0000	Schreiberverstärker
6.	2.0000	Schichtdicke
7.	0.0500	eingesetzte Enzymmenge
8.	0.9440	Proteingehalt in der benutzten Enzympräparation in mg/ml

$$F = 0.00478403 \times 100.0000 = 0.478403$$

(100.0000)						
n	V	1/V	S	1/S	S/V	V/S
	:	x			x	:
	100.0000					
10.00	/ 4.7840 /	.2090	/ .0612 /	16.3398	/ .012792 /	78.170522
9.50	/ 4.5448 /	.2200	/ .0492 /	20.3252	/ .010825 /	92.374678
9.00	/ 4.3056 /	.2322	/ .0368 /	27.1739	/ .008546 /	117.000880
8.50	/ 4.0664 /	.2459	/ .0306 /	32.6797	/ .007525 /	132.889888
8.00	/ 3.8272 /	.2612	/ .0245 /	40.8163	/ .006401 /	156.213420
7.50	/ 4.4730 /	.2235	/ .0430 /	23.2558	/ .009613 /	104.024968

KY* : 0.012220 kein Hemmstoff im Ansatz
VMAX* : 0.057202

KY : 0.012216 S.E. (KY) : 0.000557
VMAX : 0.057193 S.E. (VMAX) : 0.000627

4.00	/ 1.9136 /	.5225	/ .0245 /	40.8163	/ .012802 /	78.106710
4.63	/ 2.2150 /	.4514	/ .0306 /	32.6797	/ .013814 /	72.385904
5.00	/ 2.3920 /	.4180	/ .0368 /	27.1739	/ .015384 /	65.000489
6.00	/ 2.8704 /	.3483	/ .0492 /	20.3252	/ .017140 /	58.341902

KY* = Kp* 0.047968 Hemmstoffkonzentration 0.9 μM 6-ANADP
VMAX* : 0.056316

KY = Kp 0.047975 S.E. (KY) : 0.007065
VMAX : 0.056228 S.E. (VMAX) : 0.004711

5.50	/ 2.6312 /	.3800	/ .0245 /	40.8163	/ .009311 /	107.396726
6.20	/ 2.9661 /	.3371	/ .0306 /	32.6797	/ .010316 /	96.931444
6.80	/ 3.2531 /	.3073	/ .0368 /	27.1739	/ .011312 /	88.400665
7.50	/ 3.5880 /	.2787	/ .0492 /	20.3252	/ .013712 /	72.927374

KY* = Kp* 0.0274420 Hemmstoffkonzentration 0.4 μM 6-ANADP
VMAX* : 0.056182

KY = Kp 0.027421 S.E. (KY) : 0.002149
VMAX : 0.056175 S.E. (VMAX) : 0.001959

Abbildung 27 a: Mathematische Berechnung von K_m und V_{max}
nach der Methode von WILKINSON (1961).

ENZYM: **6-P-GD**

ORGAN: **13 Tage-Embr.** DATUM: **6.11.69**

1.	0.7000	Gesamtvolumen
2.	0.0200	Faktor für Umrechnung von % Ausschlag auf $\Delta E/min$
3.	1.0000	Enzymverdünnung
4.	6.2000	Extinktionskoeffizient
5.	5.9000	Schreiberverstärker
6.	2.0000	Schichtdicke
7.	0.0500	eingesetzte Enzymmenge
8.	0.9440	Proteingehalt in der benutzten Enzympräparation in mg/ml

$$F = 0.00478403 \times 100.0000 = 0.478403$$

		(100.0000)					
n	V	1/V	S	1/S	S/V	V/S	
	:	x			x	:	
	100.0000						
6.40	/ 3.0617 /	.3266 /	.0245 /	40.8163 /	.008001 /	124.970736	
7.00	/ 3.3488 /	.2986 /	.0306 /	32.6797 /	.009137 /	109.438732	
7.50	/ 3.5680 /	.2787 /	.0368 /	27.1739 /	.010256 /	97.500733	
8.30	/ 3.9707 /	.2518 /	.0492 /	20.3252 /	.012390 /	80.706298	

Hemmstoffkonzentration 0,3 μM 6-ANADP

$$K_M = K_P \cdot 0.020719$$

$$V_M A = 0.056294$$

$$K_M = K_P \cdot 0.020722$$

$$S.F.(K_M) = 0.000770$$

$$V_M A = 0.056295$$

$$S.F.(V_M A) = 0.000780$$

3.16	/ 1.5117 /	.6614 /	.0245 /	40.8163 /	.016206 /	61.704301	
3.73	/ 1.7844 /	.5603 /	.0306 /	32.6797 /	.017148 /	58.315210	
4.20	/ 2.0092 /	.4976 /	.0368 /	27.1739 /	.018314 /	54.600410	
5.00	/ 2.3920 /	.4180 /	.0492 /	20.3252 /	.020568 /	48.618252	

Hemmstoffkonzentration 1,4 μM 6-ANADP

$$K_M = K_P \cdot 0.065653$$

$$V_M A = 0.055895$$

$$K_M = K_P \cdot 0.065651$$

$$S.F.(K_M) = 0.002227$$

$$V_M A = 0.055899$$

$$S.F.(V_M A) = 0.001212$$

2.30	/ 1.1093 /	.9035 /	.0245 /	40.8163 /	.022266 /	44.911358	
3.10	/ 1.3299 /	.7517 /	.0306 /	32.6797 /	.023098 /	43.462810	
3.80	/ 1.5308 /	.6532 /	.0368 /	27.1739 /	.024038 /	41.600313	
3.87	/ 1.8514 /	.5401 /	.0492 /	20.3252 /	.026574 /	37.631527	

Hemmstoffkonzentration 2,22 μM 6-ANADP

$$K_M = K_P \cdot 0.07150$$

$$V_M A = 0.055214$$

$$K_M = K_P \cdot 0.07150$$

$$S.F.(K_M) = 0.009344$$

$$V_M A = 0.05521$$

$$S.F.(V_M A) = 0.003434$$

Zu den Abbildungen 27 und 27 a:

Benutzt wurde ein programmierbares Rechensystem (WANG 370).

Das Rechenprogramm steht unter 3.

Gezeigt ist der Originalausdruck der Teletype. Nach Eingabe der Meßwerte und der Versuchsbedingungen in die Rechenmaschine werden die für die verschiedenen graphischen Darstellungen benötigten Parameter ausgedruckt. ($1/v$, $1/s$, s/v , v/s). Nach Ablauf des Rechenprogramms werden die K_m - bzw. K_p -Werte und die V_{max} -Werte mit den Standardabweichungen (S.E.) ausgedruckt. Die V_{max} -Werte zeigen bei den verschiedenen Hemmstoff-Konzentrationen die für den kompetitiven Hemmungstyp charakteristischen Übereinstimmungen.

K_m -Wert bzw. K_p -Werte: mM NADP⁺

V_{max} -Werte: $\mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

2.2. Einfluß des Antimetaboliten 6-ANADP auf die Kinetiken

einiger löslicher Fermente von Säugetier-Embryonen und

Lebergewebe.

2.2.1. Methode

Die Präparation der Hyaloplasma-Fraktion der 13-Tage-alten Rattenembryonen und der Leberzellen erwachsener, nicht schwangerer Tiere wurde wie unter 1.2.1. durchgeführt. Als Puffer für die Sephadex-Säule benutzten wir Phosphat-Puffer nach SØRENSEN, pH 7,4. Die Versuchsansätze zur Messung der G-6-PD und 6-P-GD sind bereits beschrieben. Die Auswertung der Messungen erfolgte nach den verschiedenen graphischen Methoden wie nach LINEWEAVER-BURK, DIXON und HUNTER and DOWNS. Außerdem wurde v gegen v/s und s/v gegen s aufgetragen. Nach der entsprechenden Formel aus DIXON und WEBB (1958):

$K_p = K_m (1 + \frac{I}{K_I})$ kann $K_I = \frac{I \cdot K_m}{K_p - K_m}$ bei einem kompetitiven Hemm-Typ aus den K_p -Werten errechnet werden. Hierbei ist "Kp" der K_m -Wert bei Anwesenheit einer bestimmten Konzentration eines kompetitiven Hemmstoffs. Diese "Kp-Werte" können aus den Diagrammen $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{s}$ und s/v gegen s abgelesen werden. Aber auch die statistische Methode, die WILKINSON (1961) für die Bestimmung von K_m und V_{max} entwickelte, eignet sich für die K_p -Berechnung.

Die Abbildungen 22 bis 26 zeigen die genannten graphischen Darstellungen am Beispiel der Hemmung der 6-P-GD in einer Hyaloplasma-Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen. Aus ihnen ist zu entnehmen, daß die 6-P-GD streng kompetitiv durch 6-ANADP in vitro gehemmt wird. Die mathematische Berechnung mit einer WANG-Rechenmaschine mit Teletype (ausführlicher siehe 3. Rechenprogramme) zeigt der in den Abbildungen 27 und 27a wiedergegebene Ausdruck der Teletype. Die mathematischen Werte stimmen gut mit

Tabelle 11: Berechnung des K_i -Wertes nach der

$$\text{Formel } K_i = \frac{i \cdot k_m}{k_p - k_m} \quad (\text{s. DIXON und WEBB 1958})$$

i $\mu\text{M 6-ANADP}$	k_p $\mu\text{M NADP}^+$	errechneter K_i -Wert $\mu\text{M 6-ANADP}$
2,22	97	31,0
1,37	66	30,4
0,91	48	30,4
0,42	27	36,6
0,27	21	36,0
		$\bar{M} \ 32,9 \pm 3,1$

Die k_p -Werte und der k_m -Wert wurden mit der statistischen Methode nach WILKINSON (1961) errechnet.

$$k_m = 12 \mu\text{M NADP}^+$$

den Daten überein, die aus den graphischen Darstellungen abgelesen wurden. Die Tabelle 11 zeigt die K_i -Berechnung aus den ausgedruckten $K_m \approx "K_p"$ -Werten. Die Streuung ist - gemessen an den möglichen Fehlerquellen bei der Messung - gering.

Eine weitere - auch von DIXON und WEBB (1958) für die kompetitive Hemmung angegebene Formel:

$$K_i = \frac{v_i}{v - v_i} \cdot \frac{K_m}{s + K_m} \cdot i$$

eignet sich für die K_i -Berechnung aus dem für dieses Ferment bekannten K_m -Wert und nur einem Meßpaar v und v_i . Sie ist aber gegenüber Meßfehlern weit empfindlicher, da hier nur der K_m -Wert aus einer Vielzahl von Messungen erhalten wurde.

Tabelle 12: ki-Werte der G-6-PD aus dem Hyaloplasma
13-Tage-alter Rattenembryonen.

Datum	Reaktionsansatz ohne Hemmstoff		ki-Werte μM 6-ANADP			
	km μM NADP ⁺	Vmax $\frac{\mu\text{mole}}{\text{min} \cdot \text{mg Pr}}$	$i \cdot \frac{v_i}{v - v_i} / \text{s}$	kp-Formel $\bar{M}$	DIXON	
11.12.69	16,0 $\pm$ 0,1	37,7 $\pm$ 1,2	16	19 20,7	20	20
6.11.69	12,5 $\pm$ 0,5	34,2 $\pm$ 0,8		21 24,5 27	24 $\pm$ 0,3	20
19.10.69	13,6 $\pm$ 0,7	32,4 $\pm$ 0,5		31 36 30 39 22 21 16	28 $\pm$ 0,8	32

Gegenübergestellt sind die Resultate, die mit den verschiedenen Auswertungsmethoden gewonnen wurden. Die Fermentpräparationen wurden über eine Sephadex-G-25-Säule gereinigt.

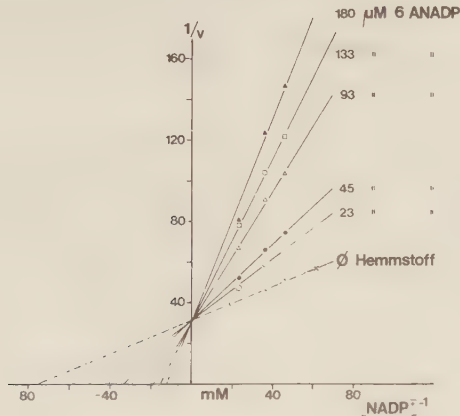
Tabelle 13: ki-Werte der G-6-PD aus dem Leber-Cytosol
erwachsener, nicht schwangerer Ratten.

Datum	Reaktionsansatz ohne Hemmstoff		ki-Werte μM 6-ANADP			
	km μM NADP ⁺	Vmax $\frac{\mu\text{mole}}{\text{min}^{-1} \text{mg Pr}^{-1}}$	$i \cdot \frac{v_i}{v - v_i} / \text{s}$	kp-Formel $\bar{M}$	DIXON	
7.11.69	19,0 $\pm$ 3,0	23,2 $\pm$ 1,4	52	64 66 42 51 54	55,4 $\pm$ 9,8	55
27.10.69	20,5 $\pm$ 0,2	33,2 $\pm$ 0,2		52 48 ^x 48 ^x		50
29. 8.69	keine Kinetik nur einzelne gehemmte und ungehemmte Werte			13 ^x 15 ^x 38 ^x	22 $\pm$ 13,9	

Die Tabelle zeigt die Zusammenstellung der ki-Werte, die mit verschiedenen Auswertungsmethoden gewonnen wurden. Die Präparationen wurden durch eine Sephadex-G-25-Säule gegeben.

$$^x k_i = \frac{v_i}{v - v_i} \cdot \frac{k_r}{s + k_m} \cdot i$$

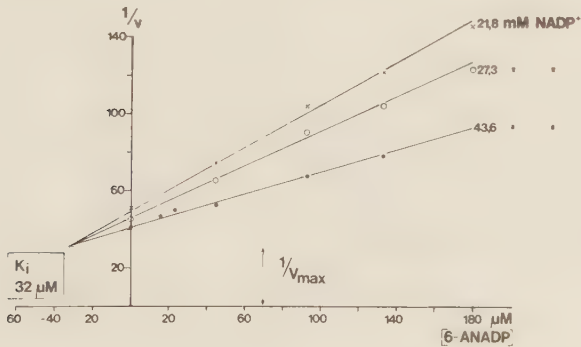
Abbildung 28: Hemmung der G-6-PD durch 6-ANADP.



Die Abbildung zeigt in doppelt reziproker Darstellung die Hemmung der G-6-PD 13-Tage-alter Rattenembryonen durch 6-ANADP.

$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

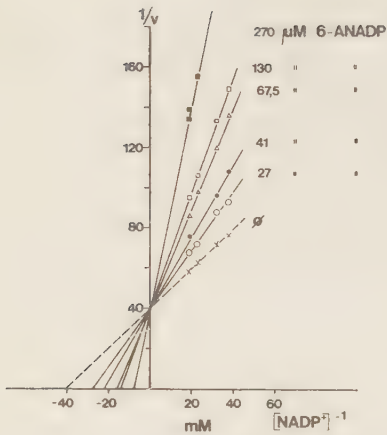
Abbildung 29 Hemmung der G-6-PD durch 6-ANADP



Die Abbildung gibt die gleichen Messungen wie in Abb. 28 in der graphischen Darstellung nach DIXON wieder.

Abbildung 30:

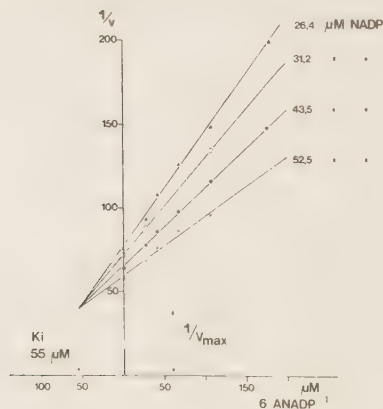
Hemmung der G-6-PD aus Leberzellen
durch 6-ANADP.



Die Abbildung zeigt die doppelt reziproke Darstellung der kompetitiven Hemmung der G-6-PD aus Leberzell-Hyaloplasma. Die Cytosol-Fraktion wurde durch eine Säulenpassage mit Sephadex G 25 gereinigt.

$$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

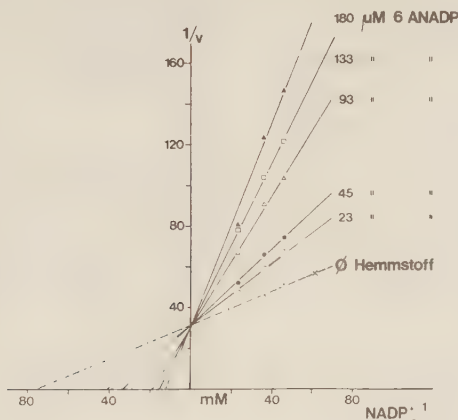
Abbildung 31: Hemmung der G-6-PD aus Leberzellen durch 6-ANADP



Das DIXON-Diagramm, die gleiche Messung der G-6-PD aus Lebergewebe unter dem Einfluß von 6-ANADP wie Abb. 30.

$$V = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

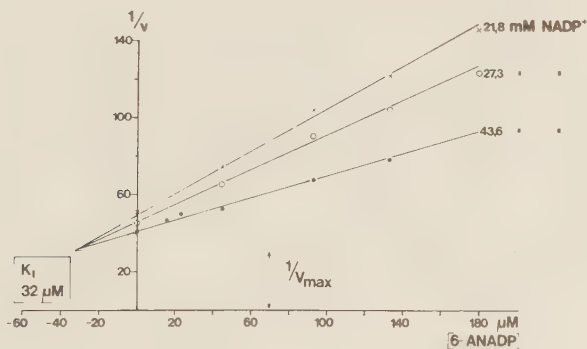
Abbildung 28: Hemmung der G-6-PD durch 6-ANADP.



Die Abbildung zeigt in doppelt reziproker Darstellung die Hemmung der G-6-PD 13-Tage-alter Rattenembryonen durch 6-ANADP.

$$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}.$$

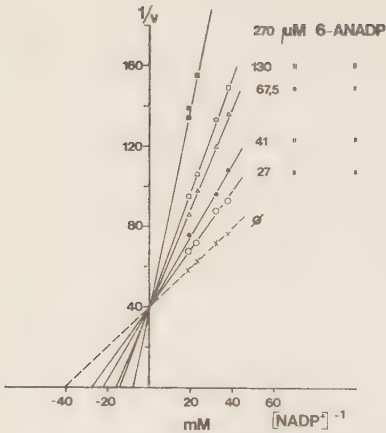
Abbildung 29 Hemmung der G-6-PD durch 6-ANADP



Die Abbildung gibt die gleichen Messungen wie in Abb. 28 in der graphischen Darstellung nach DIXON wieder.

Abbildung 30:

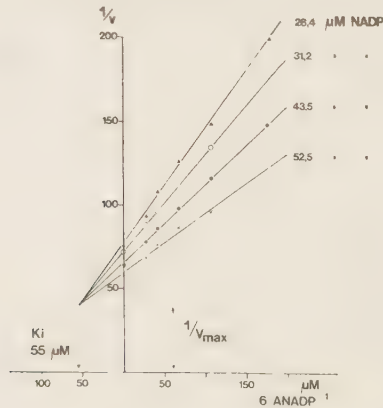
Hemmung der G-6-PD aus Leberzellen
durch 6-ANADP.



Die Abbildung zeigt die doppelt reziproke Darstellung der kompetitiven Hemmung der G-6-PD aus Leberzell-Hyaloplasma. Die Cytosol-Fraktion wurde durch eine Säulenpassage mit Sephadex G 25 gereinigt.

$$v = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

Abbildung 31: Hemmung der G-6-PD aus Leberzellen durch 6-ANADP



Das DIXON-Diagramm, die gleiche Messung der G-6-PD aus Lebergewebe unter Einfluß von 6-ANADP wie Abb. 30.

$$V = \mu\text{mole NADPH} + \text{H}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

Tabelle 14: k_i -Werte des 6-ANADP für die 6-P-GD in der Hyaloplasma-Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen.

Datum	Reaktionsansatz ohne Hemmstoff		ki-Werte μM 6-ANADP			
	km μM NADP*	Vmax $\frac{\text{mM mole}}{\text{min}} \times \frac{1}{\text{mgPr}^{-1}}$	$ \frac{v_i}{v-v_i} /s$	kp-Formel $\bar{M}$		DIXON
13. 9.69	$11,0 \pm 3,0$	$34,7 \pm 2,5$	0,4	0,45 0,47 0,49	$0,47 \pm 0,02$	0,46
11.11.69	$11,0 \pm 1,0$	$23,8 \pm 0,6$	0,3	0,55 0,42 0,34 0,35 0,59	$0,45 \pm 0,1$	0,6
6.11.69	$12,0 \pm 0,5$	$57,2 \pm 0,6$	0,3	0,30 0,31 0,30 0,36 0,36	$0,33 \pm 0,03$	0,3

Tabelle 15: k_i -Werte des 6-ANADP für 6-P-GD in der Hyaloplasma-Fraktion der Leberpräparation erwachsener, nicht schwangerer Ratten.

30. 5.69	14	94	-	0,15 0,10 0,11 0,14	$0,13 \pm 0,02$	0,12
29. 8.69	nur einzelne Meßwerte der gehemmten und ungehemmten Umsatzgeschwindigkeiten			0,13 ^x 0,14 ^x 0,1 ^x	$0,12 \pm 0,02$	-

Zusammenstellung der k_i -Werte der 6-P-GD. Die Ergebnisse wurden mit verschiedenen Auswertungsmethoden gewonnen.

^x nach der Formel: $k_i = \frac{v_i}{v - v_i} \cdot \frac{\text{km}}{s + \text{km}} \cdot 1$

2.2.2. Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend den gezeigten Beispielen wurde der Effekt von 6-ANADP in einer Reihe von Versuchsserien untersucht. Die Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der Hemmkinetiken, die mit 6-ANADP und der G-6-PD (Hyaloplasmatische Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen) durchgeführt wurden. Die K_i -Werte für 6-ANADP liegen bei den verschiedenen Präparationen und Auswertungsmethoden zwischen $1,6$ und $3,9 \cdot 10^{-5}$ M 6-ANADP. Die Abbildungen 28 und 29 zeigen die graphischen Darstellungen einer kompetitiven Hemmung der G-6-PD. Die Tabelle 13 und die Abbildungen 30 und 31 zeigen zum Vergleich die Hemmung der G-6-PD aus Rattenleber-Präparationen durch 6-ANADP. Die Hemmung der G-6-PD durch 6-ANADP erfolgt in beiden Geweben kompetitiv.

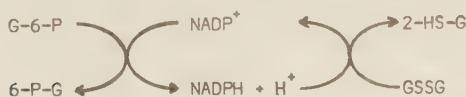
Auch die ermittelten KI-Werte für die G-6-PD in Leberzellen liegen mit $1,3$ bis $6,6 \cdot 10^{-5}$ M 6-ANADP in der gleichen Größenordnung, zumal verschiedene Chargen 6-ANADP bei den Hemmversuchen benutzt wurden. Die Werte stimmen auch gut mit den KI-Werten für Hefe-G-6-PD mit $2 \cdot 10^{-5}$ bis $3 \cdot 10^{-5}$ M 6-ANADP (COPER und NEUBERT, 1963) und für die G-6-PD - die aus Nierengewebe von LANGE und PROFT (1970) präpariert wurde - mit $1,3$ bis $1,9 \cdot 10^{-5}$ M 6-ANADP überein.

Besonders auffällig ist die Empfindlichkeit der 6-P-GD gegen 6-ANADP unter den In-vitro-Bedingungen einer Hemmkinetik. In Tabelle 14 - für embryonales Gewebe - und in Tabelle 15 - für Lebergewebe erwachsener Ratten - sind die Ergebnisse zusammengestellt. Die Ki-Werte der 6-P-GD für 6-ANADP liegen - je nach Auswertungsmethode - zwischen $3 \cdot 10^{-7}$ und $6 \cdot 10^{-7}$ M für die Präparation aus 13-Tage-alten Rattenembryonen und zwischen $1 \cdot 10^{-7}$ und $1,5 \cdot 10^{-7}$ M für das Lebergewebe. Ein Beispiel der Hemmkinetik - und deren Auswertung - der 6-P-GD mit 6-ANADP wurde unter Methoden auf Seite 48 gezeigt. LANGE und PROFT (1970) fanden für die aus Nierengewebe präparierte 6-P-GD für 6-ANADP in ihren Hemmstudien

Ki-Werte von $4,4 \cdot 10^{-7}$ und $4,9 \cdot 10^{-7}$ M. Wie aus den Tabellen 12 - 15 hervorgeht, sind die beiden NADP^+ -abhängigen Fermente des oxidativen Teils des Pentose-Phosphat-Wegs gegenüber 6-ANADP etwa zwei Zehnerpotenzen unterschiedlich empfindlich. Bei der G-6-PD liegen der Ki-Wert für 6-ANADP und die Michaelis-konstante K_m für NADP^+ in der gleichen Größenordnung. Dagegen ist der Ki-Wert der 6-P-GD um zwei Zehnerpotenzen kleiner als der K_m -Wert für NADP^+ . Da der Ki-Wert - im Gegensatz zum K_m - eine echte Gleichgewichtskonstante darstellt, kann man aus den Ergebnissen schließen, daß die 6-P-GD gegenüber dem 6-ANADP eine sehr viel größere Affinität besitzt. Dieser Befund ist zweifellos für die Überlegungen über den Wirkungsmechanismus sehr wesentlich.

Wir haben in weiteren Untersuchungsserien auch die Hemmkinetiken mit 6-ANADP für die Glutathionreduktase untersucht. Diesem Ferment wird eine schützende Funktion der SH-Gruppe von bestimmten Enzymen - wie z.B. Hexokinase und G-6-PD - zugeschrieben. Die Glutathionreduktase schützt durch bereitgestelltes, reduziertes Glutathion die essentielle SH-Gruppe der G-6-PD (RAPOPORT, 1966). Durch Hemmung der GSSG-Reduktase könnte der oxidative Teil des PPW in zweifacher Weise gestört werden:

1. durch verminderte Bereitstellung von oxidiertem NADP^+
2. durch Hemmung des Schutzmechanismus



Die unter 2. genannte Annahme wird dadurch eingeschränkt, daß $\text{NADPH} + \text{H}^+$ mit der 6-P-GD einen Enzym-Substrat-Komplex bildet, der die essentielle SH-Gruppe gegen eine Oxidation schützt. Die Tabelle 16 zeigt, daß auch die GSSG-Reduktase mit 6-ANADP reagiert. Die Ki-Werte liegen - wie bei der G-6-PD - im Bereich der gemessenen K_m -Werte zwischen 3 und $7 \cdot 10^{-5}$ M 6-ANADP.

Tabelle 16: K_i -Werte für 6-ANADP in der GSSG-Reduktase
(Hyaloplasma-Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen)

Datum	Reaktionsansatz ohne Hemmstoff		ki-Werte μM 6-ANADP			
	K_m $\mu\text{M NADPH}_2$	$V_{\max}$ $\text{m}\mu\text{ mole } \times$ $\text{min}^{-1} \text{ mg Pr}^{-1}$	$-i \frac{v_i}{v-v_i}/s$	kp-Formel $\bar{M}$		DIXON
28. 5.69	$5,6 \pm 0,3$	$9,04 \pm 0,09$	3	6,4 4,9 5,7	$5,7 \pm 0,8$	3,9
6. 7.70	$5,4 \pm 0,9$	$9,1 \pm 0,3$	3,4	3,05 2,8		3,2
22. 5.69 ^x	$5,6 \pm 0,6$	$6,0 \pm 0,1$		4,9 4,9 7,3 7,7	$6,2 \pm 1,5$	6,3

Die Tabelle zeigt die Zusammenstellung der nach verschiedenen Methoden ermittelten K_i -Werte für 6-ANADP der GSSG-Reduktase in der Cytosol-Präparation 13-Tage-alter Rattenembryonen. Für die Hemmkinetiken wurden zwei Fermentpräparationen nach einer Säulenpassage in die Reaktionsansätze eingesetzt. Bei der dritten Meßreihe - mit x gekennzeichnet - wurde eine ungereinigte Fermentpräparation benutzt.

Die Tatsache ist interessant, daß die GSSG-Reduktase auch kompetitiv gehemmt wird (Abb. 32 - 34). $\text{NADPH} + \text{H}^+$ und der nicht reduzierbare Antimetabolit 6-ANADP reagieren offenbar mit dem gleichen Bindungszentrum. Ob die GSSG-Reduktase aber in-vivo durch 6-ANADP gehemmt wird, läßt sich aus diesen In-vitro-Versuchen nicht sicher entnehmen. Der K_i -Wert läßt - ähnlich wie bei der G-6-PD - keine ausgeprägte Hemmung erwarten.

2.3. 6-P-Gluconat-Gehalt im embryonalen Gewebe und 6-AN-

Behandlung in-vivo.

Aus den Hemmkinetiken der G-6-PD und der 6-P-GD mit dem 6-ANADP, einem Analogen des NADP^+ , zeigte sich eine sehr große Empfindlichkeit der 6-P-GD. HERKEN et al. konnten bereits 1969 zeigen,

Abbildung 32: Kompetitive Hemmung der GSSG-Reduktase durch 6-ANADP in der doppelt reziproken Darstellung.

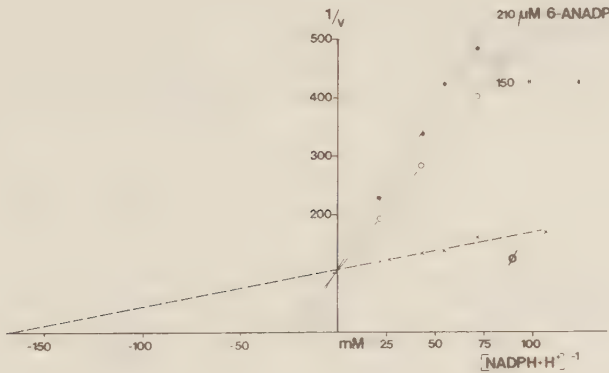


Abbildung 33: Hemmung der GSSG-Reduktase durch 6-ANADP in der Darstellung nach DIXON

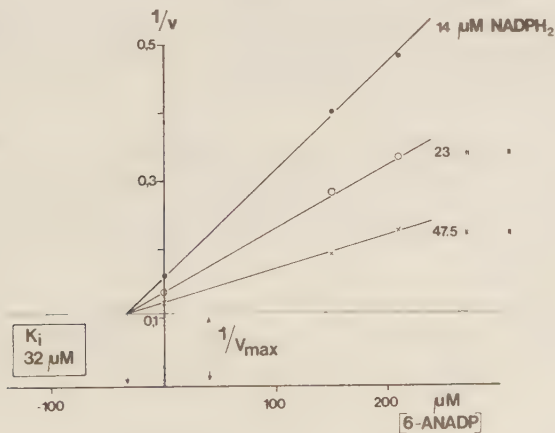
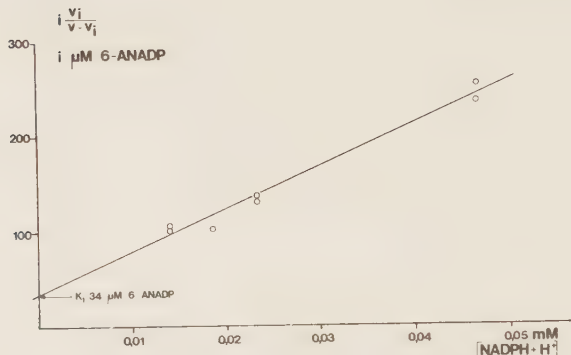


Abbildung 34: Hemmung der GSSG-Reduktase durch 6-ANADP in der
Darstellung nach HUNTER und DOWNS.



Die Abbildungen 32 bis 34 zeigen die verschiedenen Darstellungen einer Hemmkinetik der Glutathion-Reduktase in der Hyaloplasma-Fraktion 13-Tage-alter Rattenembryonen mit 6-ANADP. Die Cytosol-Fraktion wurde über eine Sephadex-Säule G 25 "coarse" gegeben, um kleinmolekulare Bestandteile abzutrennen. Die Umsatzgeschwindigkeit ist $\mu\text{mole NADP}^+ \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Der Reaktionsansatz war: GSSG 6,5 mM; $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 0,046 bis 0,009 mM variiert; Rinderalbumin 0,1 %.

Als Puffer diente Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN pH 7,4.

daß nach einer einmaligen Injektion von 6-Aminonicotinamid der Gehalt an 6-G-P und - In weit stärkerem Maße - an 6-P-G im Gehirn erwachsener Ratten von kaum meßbar auf sehr hohe Konzentration ansteigt. In Kenntnis der großen Empfindlichkeit der 6-P-GD aus den in-vitro-Messungen lag es nahe, indirekt zu prüfen, ob 6-AN in ausreichenden Konzentrationen auf den Embryo übergeht und damit in einem starken Maße in die de-novo-Synthese von NADP⁺ eingreift.

2.3.1. Methode

Die Muttertiere wurden mit verschiedenen Dosen 6-AN behandelt. Nach unterschiedlicher Einwirkungszeit erfolgte die Dekapitation der Muttertiere. Die 13-Tage-alten Embryonen wurden sorgfältig herauspräpariert, von den Eihäuten befreit und in einen gekühlten 5-ml-Glashomogenisator der Firma Braun, Melsungen, gegeben. Die Menge embryonalen Gewebes war meist kleiner als 1 g. Für eine Messung wurden etwa 8 - 20 Embryonen verwandt. Mit 3 %-iger Perchlorsäure wurde auf 5 ml aufgefüllt und mit einem Teflonpistill bei 1.000 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. 0,5 ml des Homogenates wurden sofort danach für eine DNA-Bestimmung abgenommen. Die verbliebenen 4,5 ml Homogenat wurden in einer Laborzentrifuge bei 5.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in 2 ml 3 %-iger Perchlorsäure aufgewirbelt und erneut zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereint und mit K_2CO_3 (34,5 g ad 100 ml) auf pH 6 eingestellt. Das in der Kälte ausgefallene Kaliumperchlorat wurde nach 30 Minuten abzentrifugiert. Im Überstand erfolgte die Gluconat-Bestimmung in üblicher Weise mit dem optischen Test mit Hefe-6-P-GD (Boehringer). Die Proben blieben bis zur Messung im Photometer eiskalt. Für die DNA-Bestimmung benutzen wir die Methode nach BURTON (1956). Die Meßwerte sind in ng 6-P-Gluconat x μg DNA $^{-1}$ angegeben.

2.3.2. Ergebnisse und Diskussion

-.--.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-

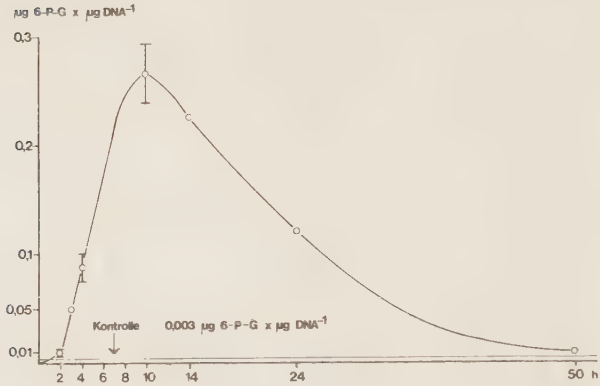
In Abhängigkeit von Dosis und Zeit konnten nach Gabe von 6-AN an das Muttertier in den Embryonen verschieden hohe 6-Phosphogluconat-Konzentrationen gemessen werden. Bei den Kontrolltieren war der 6-P-G-Gehalt bei dieser Methodik - bedingt durch die begrenzte Empfindlichkeit des benutzten Eppendorf-Photometers und die relativ hohen Fehlerquellen bei der Extraktion - nur mit hoher Streuung zu bestimmen. Er lag bei etwa 0,5 - 1 ng / μ g DNA. Bei einigen Präparationen war die 6-P-G-Konzentration unterhalb der bestimmbaren Konzentration. Bei den hohen - für Muttertier und Embryo nach einer genügend langen Zeit stets letalen - Dosen 6-AN von 25 mg und 50 mg wurde die 6-P-G-Konzentration in unseren Versuchen nur nach 4 bzw. 5 Stunden bestimmt (Tab. 17). Für 50 mg/kg ergab sich nach 5 Stunden ein Wert von 346 ng 6-P-G $\times \mu$ g DNA⁻¹ und für 25 mg 204 ng 6-P-G $\times \mu$ g DNA⁻¹. Embryotoxische Wirkungen treten aber schon nach sehr viel geringeren Dosen von 6-AN auf. Um den 6-P-G-Gehalt nach 6-AN in den Embryonen über einen langen Zeitraum bestimmen zu können, wurde die Dosis auf 5 mg/kg gesenkt. Diese Dosis liegt etwa an der Grenze der embryotoxischen Dosis. Aus der Abbildung 35 ist zu ersehen, daß die Hemmung der 6-P-Gluconat DH durch 6-ANADP nach 10 Stunden am größten ist. Die 6-P-G-Konzentration erreicht nach einer einmaligen Injektion eine Höhe von 260 ng 6-P-G $\times \mu$ g DNA⁻¹. LANGE et al. (1970) konnten bereits an Rattennieren erwachsener Tiere zeigen, daß der 6-P-G-Gehalt nach 7 Stunden - bei allerdings 35 mg 6-AN pro kg - auf das über 200-fache steigt. Bemerkenswert ist aber, daß weit geringere Dosen - wie in unserem Fall 5 mg 6-AN - im embryonalen Rattengewebe eine noch darüber hinaus gehende Konzentrationssteigerung bewirkt. Bei dem sehr schnell wachsenden Gewebe ist allein durch den 6-P-G-Gehalt eine schwere Störung des Energiehaushaltes und der Syntheseleistung zu erwarten. PARR (1956, 1957) konnte zeigen, daß die Glucose-6-P-Isomerase durch 6-P-G stark gehemmt wird. Die Hemmung ist kompetitiv (siehe auch HERKEN et al., 1969).

Tabelle 17: Gehalt an 6-P-Gluconat in ng/ μ g DNA 13-Tage-alter Rattenembryonen.

6-AN wurde jeweils den Stunden der Einwirkzeit entsprechend vor Beginn der Präparation den Muttertieren i.p. gespritzt.

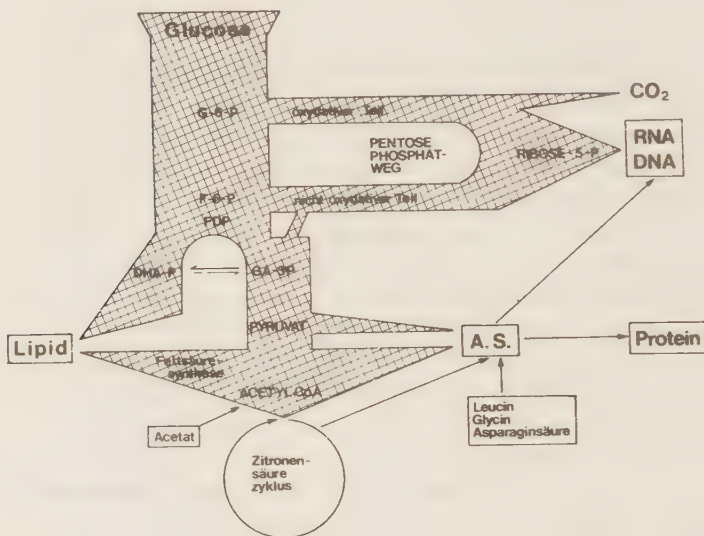
Kontrolltiere	5 mg 6-AN pro kg i.p.					
	2 Std.	3 Std.	4 Std.	10 Std.	14 Std.	24 Std.
0,67 0,44 0,85 1,02 0,76 0,69	6 5 10 12 8 $\pm$ 3	 50 50	78 84 100 87 $\pm$ 11	240 240 300 260 $\pm$ 30	230 230	120 120
						10 10 7 8 8 7 8 $\pm$ 1
0,74 $\pm$ 0,19	50 mg 6-AN pro kg		25 mg 6-AN pro kg			
	5 Stunden		5 Stunden			
	349 361 346 304 369		220 188 204 $\pm$ 20			
	346 $\pm$ 25					

Abbildung 35: Anreicherung von 6-P-G in Rattenembryonen nach
Gabe von 5 mg/kg 6-AN an die Muttertiere.



Die schwangeren Ratten wurden jeweils der Einwirkzeit entsprechend vor Versuchsbeginn mit 5 mg 6-AN pro kg i.p. behandelt und am Tag 13 der Schwangerschaft getötet.

Abbildung 36: Vereinfachte Darstellung des Glucose-Stoffwechsels.



Die Abbildung zeigt die Einschleusungspunkte für Glucose, Acetat und die Aminosäuren, Leucin, Glycin und Asparaginsäure. Diese wurden als ¹⁴C-markierte Vorstufen für die Lipid- und Proteinsynthese den intakten Embryonen in einem in-vitro-Test angeboten.

2.4.2. Methode

Trächtige Ratten wurden mit 8 mg 6-AN/kg 10 Stunden vor Beginn des Experimentes behandelt. Die 13 Tage alten Embryonen wurden nach Dekapitieren der Muttertiere herauspräpariert, das Fruchtwasser vorsichtig abgetupft und in ein 25 ml Erlenmeyer-Kölbchen gegeben. Das Inkubationsmedium war KREBS-RINGER-Phosphat-Puffer (2 ml) pH 7,5 (mit 0,1 % Glucose bei den Versuchen mit markiertem Acetat und markierten Aminosäuren). Das Medium mit den Embryonen wurde 1 min. mit Sauerstoff durchströmt, die Gefäße mit fest schließenden Gummikappen verschlossen und bei 37° C 2 Minuten in einem Wasserbad vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µCi der jeweiligen Aminosäure bzw. Acetat oder radioaktiv markierter Glucose mit Hilfe einer Hamilton-Spritze durch die Gummikappe gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Reaktion mit 2 ml eiskalter Perchlorsäure (0,4 n) gestoppt und das Reaktionsgefäß in Eis gestellt. Die Embryonen wurden dann in Zentrifugenröhrchen überführt, abgespült mit 2 %iger Perchlorsäure, in 5 ml 0,2 n Perchlorsäure homogenisiert und bei 5.000 U/min in einer Laborzentrifuge abgefahren. Das Sediment der Perchlorsäurefällung wurde 6 x mit 5 ml 0,2 n Perchlorsäure gewaschen. Anschließend wurden durch dreimaliges Waschen mit Alkohol/Äther (3 + 1) und einmaliges Waschen mit jeweils 5 ml Äther die Lipide extrahiert. Dann erfolgte eine RNA-Extraktion nach SCHMIDT-TANNHAUSER (1945). Das Sediment wurde in 1,5 ml 0,3 n NaOH aufgewirbelt und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Es schloß sich eine Fällung durch Zusatz von 0,75 ml 10 %iger Perchlorsäure an. Nach dem Abzentrifugieren befand sich im Überstand das RNA-Hydrolysat. Das Sediment wurde zur Entfernung von eventuellen RNA-Rückständen noch einmal mit 2 %iger Perchlorsäure nachgewaschen und erneut abzentrifugiert. Zur Extraktion der DNA wurde das Sediment mit 2 ml 5 %iger Perchlorsäure versetzt und 15 min. bei 75° C inkubiert. Danach wurde abzentrifugiert. Der Überstand enthält die gelöste DNA. Reste der gelösten DNA wurden durch erneutes

Waschen mit 2 %iger Perchlorsäure und anschließendem Zentrifugieren entfernt. Die Bestimmung der DNA erfolgte nach BURTON (1956). Das Sediment soll nur noch Protein enthalten. Es wurde in 0,5 ml 10 %iger NaOH gelöst und davon 0,2 ml in die Zählröhrchen einpipettiert. Von den anderen Fraktionen wurden jeweils 0,5 ml zum Zählen eingesetzt. Für die Radioaktivitätsmessungen wurde ein Flüssigkeits-Szintillations-Zähler der Firma Packard, Modell 3380, benutzt, mit externer Standardisierung. Alle erhaltenen Werte wurden auf den DNA-Gehalt der Probe bezogen.

2.4.3. Ergebnisse und Diskussion

.....

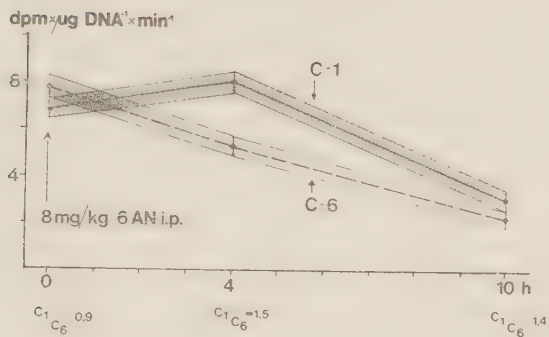
2.4.3.1. Einbau von ^{14}C -Glucose in den Riboseanteil von Nucleinsäuren.

.....

Bereits frühzeitig konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß der Einbau von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in den Riboseanteil der Nucleinsäuren (DNA und RNA) im embryonalen Gewebe - auch nach hochgradiger Hemmung des oxidativen Teils des PPW durch 6-AN - zunächst nicht gehemmt ist (KÖHLER und NEUBERT, 1968; KÖHLER, 1970; KÖHLER et al., 1970; NEUBERT et al., 1971). Offenbar reicht der Einbau über den nicht-oxidativen Teil des PPW voll aus, um den Block im oxidativen Teil des PPW zu kompensieren. Erst bei exzessiver Anhäufung von 6-P-G - und damit verbundenen, ausgeprägten sekundären Stoffwechselveränderungen - wird auch auf dem nicht-oxidativen Teil des PPW vermindert Ribose gebildet. Zu diesem Stadium ist jedoch auch der Glucose-Verbrauch des embryonalen Gewebes bereits deutlich herabgesetzt.

Mit dem jetzt von uns benutzten Rattenstamm SW 69 - der gegenüber 6-AN etwas empfindlicher reagiert als die in unserer Arbeitsgruppe vorher benutzten Wistar-Stämme - gelang es, die ursprünglichen Daten von KÖHLER (1970) noch deutlicher herauszuarbeiten. Ergebnisse solcher Versuche sind in der Abbildung 37 wiedergege-

Abbildung 37: Einbau von ^{14}C -Glucose in den Ribose-Anteil der RNA



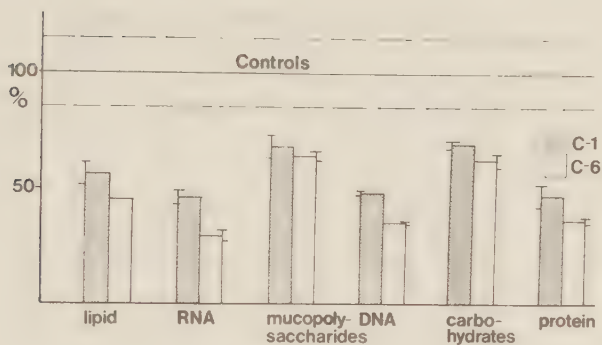
8 mg/kg 6-AN wurden den Muttertieren i.p. injiziert. Intakte Embryonen dieser Tiere wurden in einem in-vitro-Versuchsansatz mit ^{14}C -Glucose inkubiert

ben. Bis zu einem Zeitraum von 4 Stunden nach Gabe des 6-AN an das Muttertier kann bei einer Messung des Einbaus in den Riboseanteil der RNA aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ - bzw. $6\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose durch die Embryonen in-vitro nur ein verminderter Einbau von $6\text{-}^{14}\text{C}$ nachgewiesen werden. Der Einbau von $1\text{-}^{14}\text{C}$ bleibt vollständig normal. Da $1\text{-}^{14}\text{C}$ ohnehin nur über den nicht-oxidativen Weg in Ribose eingebaut werden kann, ist dies ein Hinweis auf einen Block im oxidativen Teil des PPW bei erhaltenem nicht-oxidativen Teil. Als Beweis für eine solche Annahme kann die ebenfalls in der Abbildung 37 wiedergegebene Relation des Einbaus C_1/C_6 dienen. Der Anstieg dieses Quotienten von 0,9 auf 1,5 charakterisiert die vorliegende Stoffwechselstörung. Es ist bemerkenswert, daß in diesen Versuchen bei dem benutzten Stamm SW 69 diese Relation sich auch nach 10-stündiger Wirkung des 6-AN nicht ändert - trotz deutlicher Verminderung der gesamten Glucose-Aufnahme durch den Embryo. Wohl darum ist - wie Abbildung 38 zeigt - der Einbau von ^{14}C -Glucose nach dieser Zeit in allen Zellfraktionen etwa gleich (zu ca. 50 %) vermindert. Bei dem jetzt benutzten Tierstamm tritt der von KÖHLER (1970) beobachtete sekundäre Effekt, der sich in einer Verschiebung des beschriebenen Quotienten C_1/C_6 sowie in einer Einbau-Hemmung - besonders in Lipide und Proteine bei sich wieder normalisierendem Nucleinsäure-Stoffwechsel - äußert, erst nach einem Zeitraum von länger als 10 Stunden auf.

2.4.3.2. Acetat

Acetat wird auch nach Behandlung der Muttertiere mit 8 mg/kg 6-AN nach 12 Stunden Einwirkzeit - also zu der Zeit, zu der der oxidative Teil des Pentose-Phosphat-Weges fast vollständig blockiert ist - unter "in-vitro-Bedingungen" noch gut in die Lipide eingebaut (Tab.18). Das bedeutet, daß für die Aktivierung des Acetats, d.h. für die Bildung von Acetyl-CoA, genügend energiereiche Verbindungen in dem embryonalen Gewebe vorhanden sind. Weiter ist anzunehmen, daß Energie und Kohlehydratbruchstücke für die Synthese der Fettsäuren, Triglyceride und Phosphatide, Zerebroside, Sterine, Lipochrome bzw. Wachse - d.h. alle Substanzen, die mit

Abbildung 38: Einfluß des 6-AN auf den Einbau von ^{14}C -Glucose
in die Hauptbestandteile embryonalen Gewebes.



Trächtige Ratten wurden 10 Stunden vor Versuchsbeginn mit 8 mg/kg 6-AN i.p. behandelt. In einem in-vitro-System wurde den Embryonen ^{14}C -markierte Glucose angeboten.

Tabelle 18: Einbau von Acetat

13-Tage-alte Rattenembryonen, 1 x 8 mg/kg 6-AN 12 Stunden vor Versuchsbeginn

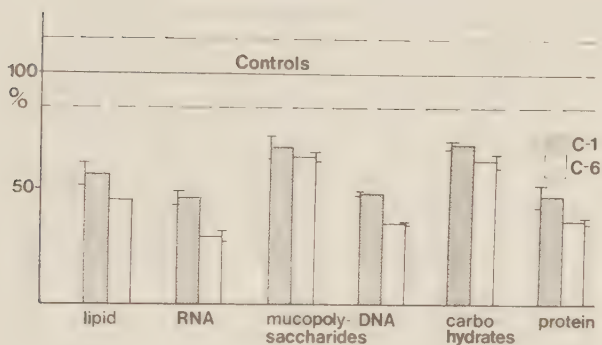
Säurelösliche Fraktion	30''	n	Ko 10'	n	6-AN 10'	n	p ko/6-AN	% der Kontrolle
1. + 2. Waschung	1248 ± 179,7	10	1393,8 ± 214,5	5	1363,4 ± 284,3	5		
letzte Waschung	0	10	0,9 ± 0,3	5	1,7 ± 0,4	4		
Lipide Äther/Alkohol	0,2 ± 0,1	10	143,6 ± 27,8	5	189,4 ± 23,0	4	< 0,025	132 ± 16
RNA	Leerwert	10	4,3 ± 0,9	5	5,6 ± 0,7	5	< 0,025	130 ± 16
DNA	Leerwert	10	2,5 ± 0,2	4	4,5 ± 0,6	4	< 0,0005	180 ± 22
Protein	Leerwert	8	11,9 ± 0,5	4	20,1 ± 1,1	4	< 0,0005	155 ± 32

Alle Werte dpm x 10³ / m² x µg DNA⁻¹, Leerwerte sind jeweils < 1 %.

Die Tabelle zeigt den Einbau von radioaktiv markiertem Acetat in die Hauptbestandteile der Säugetierzellen.

Die 30-sec-Leerwerte sind von den Meßwerten (10 min Inkubation) abgezogen worden. Die Leerwerte betragen bei RNA, DNA und Proteinen höchstens 5 % der Meßwerte. Die Einbauraten in die Lipid-Fraktion sind unzuverlässig (Leerwert: ≈ 3 dpm).

Abbildung 38: Einfluß des 6-AN auf den Einbau von ^{14}C -Glucose
in die Hauptbestandteile embryonalen Gewebes.



Trächtige Ratten wurden 10 Stunden vor Versuchsbeginn mit 8 mg/kg 6-AN i.p. behandelt. In einem in-vitro-System wurde den Embryonen ^{14}C -markierte Glucose angeboten.

Tabelle 18: Einbau von Acetat

13-Tage-alte Rattenembryonen, 1×8 mg/kg 6-AN 12 Stunden vor Versuchsbeginn

Säurelösliche Fraktion	30°C	n	Ko 10°	n	6-AN 10°	n	p Ko/6-AN	% der Kontrolle
1. + 2. Waschung	$1248 \pm 179,7$	10	$1393,8 \pm 214,5$	5	$1363,4 \pm 284,3$	5		
letzte Waschung	0	10	$0,9 \pm 0,3$	5	$1,7 \pm 0,4$	4		
Lipide Äther/Alkohol	$0,2 \pm 0,1$	10	$143,6 \pm 27,8$	5	$189,4 \pm 23,0$	4	$< 0,025$	132 ± 16
RNA	Leerwert	10	$4,3 \pm 0,9$	5	$5,6 \pm 0,7$	5	$< 0,025$	130 ± 16
DNA	Leerwert	10	$2,5 \pm 0,2$	4	$4,5 \pm 0,6$	4	$< 0,0005$	180 ± 22
Protein	Leerwert	8	$11,9 \pm 0,5$	4	$20,1 \pm 1,1$	4	$< 0,0005$	155 ± 32

Alle Werte dpm $\times 10 \text{ min}^{-1} \times \mu\text{g DNA}^{-1}$, Leerwerte sind jeweils $< 1\%$.

Die Tabelle zeigt den Einbau von radioaktiv markiertem Acetat in die Hauptbestandteile der Säugerzellen.

Die 30-sec-Leerwerte sind von den Meßwerten (10 min Inkubation) abgezogen worden. Die Leerwerte betragen bei RNA, DNA und Proteinen höchstens 5 % der Meßwerte. Die Einbauraten in die Lipid-Fraktion sind unzuverlässig (Leerwert: ≈ 3 dpm).

einer Äther-Alkohol-Fraktionierung in Lösung gebracht werden können, ohne eine genauere Auftrennung durchzuführen - kaum limitierend geworden sind. Bemerkenswert ist noch, daß $\text{NADPH} + \text{H}^+$ - das für eine Lipid-Synthese aus Acetat benötigt wird - ebenfalls nicht zu limitieren scheint. Die ausgefallene Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ durch den oxidativen Teil des PPW kann also offenbar durch andere $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -bildende Reaktionen kompensiert werden. Die anderen $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -synthetisierenden Fermente sind entweder gegenüber den gebildeten Konzentrationen der Analogen der Wasserstoff übertragenden Co-Fermente weit unempfindlicher als die 6-P-GD im oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Weges, oder die Analogen erreichen in den Kompartments, in denen die Bildung abläuft, eine geringere Konzentration.

Auch der Einbau von ^{14}C -Acetat in die Nucleinsäure-Fractionen und in die Proteine ist unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen nach Gabe von 6-AN nicht reduziert. Im Gegenteil kann bei fast allen Fractionen eine erhöhte spezifische Aktivität (dpm/ μg DNA) nachgewiesen werden. Zwei Erklärungen bieten sich hierfür an:

1. entweder der Einbau von C_2 -Bruchstücken ist tatsächlich erhöht - möglicherweise steht nach der Acetat-Gabe mehr Acetyl-CoA zur Verfügung oder
2. die Pool-Größen für entscheidende Metaboliten sind unter der Wirkung von 6-AN erniedrigt worden, so daß eine höhere spezifische Aktivität dieser Metaboliten erreicht wird und ein höherer Einbau vorgetäuscht wird.

Welcher dieser beiden Möglichkeiten eine wesentlichere Rolle zukommt, ist zur Zeit nicht zu entscheiden. Die Resultate ergeben jedoch keinen Anhalt dafür, daß unterhalb der Stufe des Pyruvats (Acetyl-CoA) nach Gabe von 6-AN ein wesentlicher Ausfall vorliegt.

2.4.3.3. Aminosäuren

.....

Weitere Experimente wurden mit ^{14}C -markierten Aminosäuren durchgeführt. Auch in diesen Fällen wurde ein Einbau in Proteine, im Falle der Substanzen Glycin und Asparaginsäure - die auch Metaboliten des Purin- bzw. Pyrimidin-Stoffwechsels darstellen - auch ein Einbau in Nucleinsäuren (RNA und DNA) des embryonalen Gewebes gemessen.

Die freien, nicht eingebauten Aminosäuren lassen sich schlechter als Acetat mit Perchlorsäure "auswaschen". Daher erscheinen bei der sich in der benutzten Methode anschließenden Äther/Alkohol-Fraktionierung bei den 30-Sekunden-Leerwerten relativ hohe Radioaktivitäten. Um die in den einzelnen Fraktionen gemessenen Aktivitäten vergleichen zu können, wurden die 30-Sek.-Werte von den 10-Min.-Werten abgezogen. Bei der Lipid-Fraktion werden wegen des hohen Leerwertes dann recht unzuverlässige Daten erhalten. Der Einbau betrug nur etwa das Doppelte bis Dreifache des Leerwertes. Bei den anderen Fraktionen betrug der Leerwert höchstens 5 % des 10-Min.-Meßwertes - meist bedeutend weniger, so daß diese Daten echte Einbauraten darstellen.

Die Aminosäure Glycin (Tab. 19) wird erwartungsgemäß am besten in die Proteine - bei Kontrollen und mit 6-AN-behandelten Tieren gleich gut - eingebaut. Aber auch in die Nucleinsäuren wird - vermutlich über die Purin-Synthese - eine deutlich meßbare Menge der radioaktiven Aminosäure eingebaut. Unter der Wirkung von 6-AN - in vivo appliziert - ist eine gerade signifikante Verminderung (um etwa 30%) des Einbaus nachzuweisen. Die Lipid-Fraktion ist nicht auszuwerten.

Die Protein-Fraktion wird gegenüber den anderen Fraktionen auch durch Asparaginsäure - bei Kontrolltieren und 6-AN-behandelten Tieren etwa gleich - am stärksten markiert (Tab. 20). Über die Pyrimidin-Synthese werden markierte ^{14}C -Bruchstücke auch in die

Tabelle 19: Einbau von Glycin

13-Tage-alte Rattenembryonen, $1 \times 8 \text{ mg/kg}$ 6-AN 12 Stunden vor Versuchsbeginn

Säurelösliche Fraktion	$30''$	n	ko $10'$	n	6-AN $10'$	n	p ko/6-AN	% der Kontrolle
1. + 2. Waschung	$1339,7 \pm 202,0$	10	$1247,5 \pm 256,4$	5	$1718,2 \pm 181,6$	5		
letzte Waschung	$0,7 \pm 0,2$	10	$1,1 \pm 0,2$	5	$0,9 \pm 0,1$	5		
Lipide Äther/Alkohol	Leerwert	10	$5,2 \pm 0,1$	3	$3,4 \pm 0,2$	3	$< 0,03$	58 ± 18
RNA	Leerwert	9	$6,7 \pm 0,6$	5	$4,8 \pm 1,1$	5	$< 0,005$	72 ± 17
DNA	Leerwert	10	$12,0 \pm 0,2$	4	$8,4 \pm 1,7$	5	$< 0,01$	70 ± 14
Protein	Leerwert	10	$43,8 \pm 4,9$	5	$41,7 \pm 6,4$	3	$< 0,35$	80 ± 23

Alle Werte $\text{dpm} \times 10 \text{ min}^{-1} \times \mu\text{g DNA}^{-1}$

Die Tabelle zeigt den Einbau von radioaktiv markiertem Glycin in die Hauptbestandteile der Säugtierzellen.

Die 30-sec-Leerwerte sind von den Meßwerten (10 min Inkubation) abgezogen worden. Die Leerwerte betragen bei RNA, DNA und Proteinen höchstens 5 % der Meßwerte. Die Einbausraten in die Lipid-Fraktons sind unzuverlässig (Leerwert: $\approx 3 \text{ dpm}$).

Tabelle 20: Einbau von Asparaginsäure

13-Tage-alte Rattenembryonen, $1 \times 8 \text{ mg/kg } 6\text{-AN}$ 12 Stunden vor Versuchsbeginn

Säurelösliche Fraktion	$30''$	n	Ko $10'$	n	6-AN $10'$	n	p ko/6-AN	% der Kontrolle
1. + 2. Waschung	$1287,7 \pm 315,8$	9	$1335,2 \pm 221,0$	5	$1362,6 \pm 238,5$	5		
letzte Waschung	$0,8 \pm 0,2$	10	$0,8 \pm 0,3$	5	$1,0 \pm 0,3$	5		
Lipide Äther/Alkohol	Leerwert	10	$6,0 \pm 1,6$	4	$6,2 \pm 2,0$	5	$< 0,45$	103 ± 33
RNA	Leerwert	10	$3,9 \pm 0,8$	4	$6,2 \pm 1,0$	4	$< 0,005$	$159 \pm 25,8$
DNA	Leerwert	10	$8,8 \pm 1,8$	4	$10,8 \pm 3,0$	5	$< 0,15$	120 ± 34
Protein	Leerwert	9	$59,7 \pm 4,8$	4	$57,0 \pm 14,0$	5	$< 0,01$	96 ± 23

Alle Werte $\text{dpm} \times 10 \text{ min}^{-1} \times \mu\text{g DNA}^{-1}$

Die 30-sec-Leerwerte sind von den Meßwerten (10 min Inkubation) abgezogen worden. Die Leerwerte betragen bei RNA, DNA und Proteinen höchstens 5 % der Meßwerte. Die Einbaureaten in die Lipid-Fraktion sind unzuverlässig (Leerwert: $\approx 3 \text{ dpm}$).

RNA und DNA eingebaut. Auch aus diesen Werten kann geschlossen werden, daß kein Anhalt dafür besteht, daß der Einbau von Asparaginsäure - oder Bruchstücken davon - durch 6-AN oder die gebildeten Analogen wesentlich gehemmt wird.

Für Leucin (Tab. 21, Abb. 39) ist auffällig, daß die Proteine - verglichen mit den Versuchen, in denen andere Aminosäuren benutzt wurden - besonders hoch markiert sind. Warum diese Aminosäure so gut eingebaut wird, läßt sich durch diese Versuchsanordnung nicht klären. Möglich wäre ein höherer prozentualer Anteil von Leucin in den synthetisierten Proteinen oder ein kleiner Leucin-Pool und damit eine höhere spezifische Aktivität in den Zellen. Die vergleichsweise hohen "Einbauraten" in die DNA könnten durch verunreinigte Proteine in dieser Fraktion - bei der hohen spezifischen Aktivität der Proteine! - vorgetäuscht sein.

Zusammenfassung

Bis auf Glycin wurden die benutzten Präkursoren in die Lipide, Proteine und Nucleinsäuren bei den Kontrollembryonen und den Embryonen von Muttertieren, die mit 8 mg/kg 6-AN 12 Stunden vor dem Versuchsbeginn behandelt wurden, mindestens gleich gut in einem in-vitro-System eingebaut. Die Syntheseleistung ist durch 6-AN, dem Antivitamin des Niacinamid, nicht gehemmt. Ein Mangel an NADPH₂, NADH₂, ATP oder anderen energiereichen Verbindungen erscheint damit unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse stimmen mit Versuchsreihen von BRUNNEMANN et al. (1964) überein, die an einigen Organen erwachsener Tiere erhalten wurden. Nach 18 - 20 Stunden Einwirkzeit von 100 mg/kg 6-AN i.p. waren die Atmung und die Atmungsketten-Phosphorylierung an isolierten Geweben und Mitochondrien erwachsener weiblicher Ratten intakt.

Tabelle 21: Einbau von Leucin

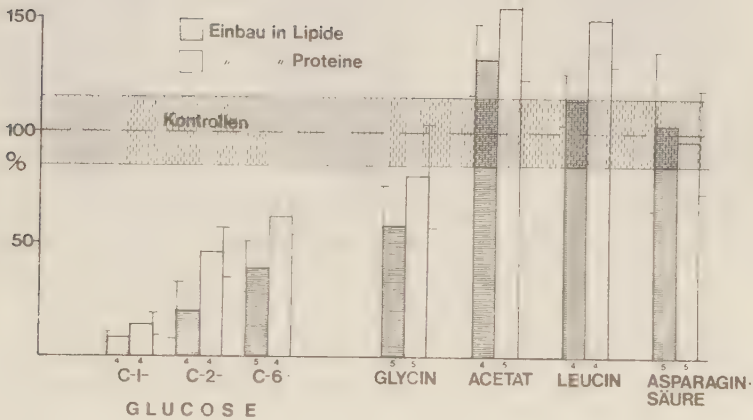
13-Tage-alte Rattenembryonen, 1 x 8 mg/kg 6-AN 12 Stunden vor Versuchsbeginn

Säurelösliche Fraktion	30'	n	ko 10'	n	6-AN 10'	n	p ko/6-AN	% der Kontrolle
1. + 2. Waschung	1206,6 ± 192,0	9	1174,0 ± 236,9	5	1556,2 ± 304,4	5		
letzte Waschung	0,84 ± 0,35	9	1,1 ± 0,5	5	1,3 ± 0,5	5		
Lipide Äther/Alkohol	Leerwert	8	11,8 ± 0,8	4	13,5 ± 1,3	4	< 0,05	114 ± 11
RNA	Leerwert	9	17,5 ± 4,1	4	16,8 ± 3,0	5	< 0,4	96 ± 17
DNA	Leerwert	9	31,2 ± 1,9	4	41,1 ± 6,4	4	< 0,0125	132 ± 20
Protein	Leerwert	9	278,0 ± 55,0	4	416,0 ± 59,0	4	< 0,0075	150 ± 21

Alle Werte dpm x 10 min⁻¹ x µg DNA⁻¹

Die 30-sec-Leerwerte sind von den Meßwerten (10 min Inkubation) abgezogen worden. Die Leerwerte betragen bei RNA, DNA und Proteinen höchstens 5 % der Meßwerte. Die Einbausraten in die Lipid-Fraktion sind unzuverlässig (Leerwert: ≈ 3 dpm).

Abbildung 39: Einbau verschiedener ^{14}C -markierter Vorstufen
in Lipide und Proteine 13-Tage-alter Ratten-
embryonen



Nach 10 Stunden Einwirkzeit von 8 mg/kg 6-AN auf die Muttertiere wurden 13-Tage-alte Rattenembryonen mit ^{14}C -markierten Vorstufen in einem In-vitro-System inkubiert.

2.5. Einfluß einer 6-AN-Behandlung des Muttertiers auf das embryonale und foetale Wachstum.

Bei den biochemischen Untersuchungen war aufgefallen, daß die Embryonen von behandelten Muttertieren kleiner waren als die der Kontrollmuttertiere. Wir haben daher eine systematische Untersuchung des Einflusses einer 6-AN-Behandlung auf das Wachstum der Keime durchgeführt. Zwei verschiedene Versuchsserien wurden angesetzt.

2.5.1. Feuchtgewichtsbestimmung am Tag 20 der Schwangerschaft

Den Rattenmuttertieren des Stammes Wistar SW 69 wurden am Tag 11 der Schwangerschaft verschiedene Dosen 6-AN einmal intraperitoneal injiziert. Am Tag 20 der Schwangerschaft wurden die Muttertiere dekapitiert und das Gewicht der Foeten festgestellt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 22 und in der Abbildung 40 wiedergegeben.

Tabelle 22

	Feuchtgewicht in Gramm	Anzahl der Foeten
Kontrollen	$2,9 \pm 0,4$	260
5 mg/kg 6-AN	$2,5 \pm 0,1$	20
8 mg/kg 6-AN	$1,9 \pm 0,2$	160

Die Tabelle zeigt das Feuchtgewicht von Rattenfoeten am Tag 20. Die Muttertiere der Kontrollfoeten wurden nicht behandelt. Die behandelten Muttertiere erhielten am Tag 11 eine einmalige Gabe 6-AN. Man kann erkennen, daß es zu einer dosisabhängigen Retardierung der Foeten kommt. Grobe Mißbildungen - außer Gaumenspalten - sind verhältnismäßig selten. Niedrige Dosen des Antimetaboliten führen zu keiner wesentlichen Retardierung, höhere Dosen sind auch für das Muttertier hoch toxisch.

Abbildung 4o



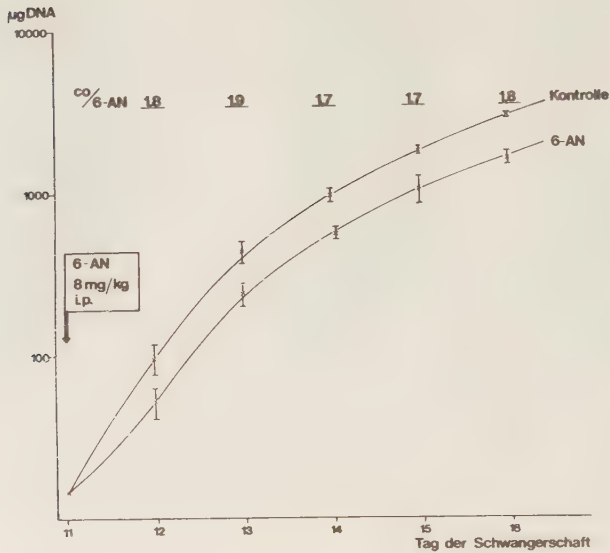
Diese Abbildung zeigt ganz rechts einen Kontroll-Rattenfoeten am Tag 2o der Schwangerschaft. Die Tiere links (ebenfalls Tag 2o) stammen von Muttertieren, die am Tag 11 der Schwangerschaft mit 5 bzw. 8 mg/kg 6-AN behandelt wurden.

2.5.2. DNA-Zuwachs bei Kontrollembryonen und Embryonen, deren Muttertiere am Tag 11 der Schwangerschaft mit 6-AN behandelt wurden.

.....

In der zweiten Serie wurde der Wachstumsverlauf nach einmaliger Gabe von 8 mg/kg 6-AN am Tag 11 an verschiedenen Stadien der Entwicklung über einen längeren Zeitraum geprüft. An den Tagen 11 bis 16 der Schwangerschaft wurden Muttertiere der Kontrollgruppe und der mit 6-AN-behandelten Gruppe getötet und die Embryonen herauspräpariert. Gemessen wurde der DNA-Gehalt der Embryonen mit einer Methode nach BURTON (1956). Wie aus der Abbildung 41 hervorgeht, ist der DNA-Zuwachs bei den Embryonen, deren Mutter-

Abbildung 41: Einfluß von 6-AN auf den DNA-Gehalt von
Rattenembryonen.



Die Abbildung zeigt den DNA-Zuwachs der Kontrollembryonen und der Embryonen, deren Muttertiere am Tag 11 der Schwangerschaft mit 8 mg/kg 6-AN behandelt wurden.

Der DNA-Quotient (Kontrolle / 6-AN-behandelt) bleibt nach dem 12. Tag der Schwangerschaft nahezu konstant.

tiere mit 6-AN behandelt wurden, zwischen den Tagen 11 und 12 der Schwangerschaft deutlich geringer. Dieser Wachstumsrückstand in den ersten 24 Stunden nach dem Behandlungsbeginn wird an den folgenden Tagen der Schwangerschaft nicht aufgeholt. Der weitere parallele Kurvenverlauf des DNA-Zuwachses der Kontrollembryonen und der Embryonen der behandelten Muttertiere zeigt, daß die Embryonen der behandelten Tiere an den späteren Tagen ihrem Alter entsprechend weiterwachsen.

2.6. Einfluß der Umgebungstemperatur der Muttertiere auf die ----- embryotoxische Wirkung von 6-AN -----

2.6.1. Einleitung -.-.-.-.-

Der Einfluß von 6-AN auf die Körpertemperatur erwachsener Tiere wurde z.B. von NANNI et al. (1961), BRUNNENMANN und COPER (1963) und COPER et al. (1966) beschrieben. Ausführliche Untersuchungen an erwachsenen Ratten wurden von LISON (1970) und COPER et al. (1971) durchgeführt. Es galt nun zu prüfen, welchen Einfluß die Hypothermie der Muttertiere auf die embryotoxische Wirkung des 6-AN hat.

2.6.2. Material und Methode -.-.-.-.-

Für diese Versuche wurden Mäuse des Stammes NMRI (bezogen von Schwenke & Co., Nauheim) benutzt. Von 7.00 - 9.00 Uhr wurden zu zwanzig weiblichen Tieren zehn männliche gesetzt. Anschließend wurden die Mäuse auf Vaginalpfröpfe untersucht. Die 24 Stunden nach dem Verpaaren und dem Auffinden der Vaginalpfröpfe wurden als Tag 0 bezeichnet. Als Nahrung diente Altromin R und Leitungswasser ad libitum.

Für die ausführliche Teratologie wurden verschiedene Dosen 6-AN 1 x an den Tagen 9, 10 und 13 der Schwangerschaft den Muttertieren subcutan injiziert. Die Muttertiere wurden dann in Räumen mit unterschiedlicher Umgebungstemperatur von 15° - 17° C, 24° C und 36° C für 32 Stunden gehalten. Die Körpertemperatur wurde mit einem Sekundenthermometer 2 cm tief im Rectum gemessen.

36° C wurde gewählt, da bei dieser Umgebungstemperatur die Körpertemperatur der mit 6-AN behandelten Tiere nicht unter die normalen Werte sinkt. Für diesen Teil des Versuches stand ein in unserer Werkstatt konstruierter Inkubator zur Verfügung. Die Temperatur wurde auf 1/10 Grad Celsius in diesem Raum gehalten. Der Sauerstoffgehalt - auch bei Dauerbetrieb mit 20 Mäusen - sank nicht unter 20 Volumenprozent.

Die tiefe Temperatur lag bei 15° - 17° C. In diesem Temperaturbereich sank die Körpertemperatur der unbehandelten Kontrollmäuse auch nach einer Woche nicht wesentlich unter die normalen Werte. Vorversuche bei 4° C zeigten auch bei Kontrollmäusen in 5 Stunden einen so rapiden Abfall der Körpertemperatur, daß diese Temperatur für unsere Fragestellung nicht geeignet war.

Bei einigen Versuchsreihen wurde auch der Gewichtsverlust der Muttertiere nach 6-AN-Behandlung unter den extremen Temperaturbedingungen bestimmt.

Für die teratologischen Untersuchungen wurden die Muttertiere am Tag 18 dekapitiert und die lebenden Foeten gezählt, gewogen und in 10 %iger Formollösung fixiert. Auffällige Mißbildungen an den Extremitäten wurden vermerkt. Die toten Foeten wurden zu den Resorptionen gezählt. Die fixierten Foeten wurden dann auf Gaumenspalten hin untersucht. Die Schnittführung erfolgte zwischen dem Ober- und Unterkiefer. Für die Auswertung stand ein Stereomikroskop zur Verfügung.

Für die biochemischen Untersuchungen wurden die Embryonen am Tag 10 der Schwangerschaft aus den Uteri herauspräpariert und in ein Erlenmeyer-Kölbchen mit 2 ml Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung pH 7,5 überführt. Der Puffer mit den Embryonen wurde 1 min. mit Sauerstoff durchströmt und mit einer Gummikappe verschlossen. Die Reaktion wurde dann mit $1\text{-C}^{14}\text{-Glucose}$ (10 $\mu\text{Ci } 1\text{-C}^{14}\text{-Glucose}$ auf 5 $\mu\text{mole Glucose}$) gestartet. Nach 10 min. Inkubieren bei 37°C wurde die Reaktion mit 2 ml 2 %iger Perchlorsäure gestoppt. Dieses Ansäuern trieb das gelöste CO_2 aus. Es wurde zusammen mit dem bei der Reaktion entstandenen CO_2 mit Phenyläthylamin gebunden, das sich in kleinen Gefäßen - in den Erlenmeyer-Kölbchen hängend - befand.

Für die Radioaktivitätsmessung in der Phenyläthylamin-Lösung wurde ein Flüssigkeits-Szintillations-Zähler der Firma Packard, Modell 3380, mit externer Standardisierung benutzt. In dem Inkubationsmedium wurde eine Glucose-Konzentrationsbestimmung mit der üblichen Hexokinase-Reaktion und eine Lactatkonzentrationsbestimmung mit der LDH im optischen Test durchgeführt. Der DNA-Gehalt der Embryonen wurde nach BURTON (1956) bestimmt. Die Ergebnisse des Glucose-Verbrauchs, der Lactat-Bildung und der CO_2 -Bildung dieses in-vitro-Testes wurden auf den DNA-Gehalt der für den Reaktionsansatz benutzten Embryonen bezogen.

2.6.3. Ergebnisse und Diskussion

.....

2.6.3.1. Temperaturkontrollen bei den Muttertieren

.....

Den Muttertieren wurden an verschiedenen Tagen der Schwangerschaft drei verschiedene Dosen 6-AN (8 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg) subcutan injiziert. Die schwangeren Mäuse reagierten bei den untersuchten Stadien, unabhängig von dem Schwangerschaftstermin, auf die 6-AN-Vergiftung und die Umgebungstemperatur. In den Abbildungen 42, 43 und 44 sind daher alle Messungen der verschiedenen Applikationstermine zusammengefaßt.

Abbildung 42

Beeinflussung der Körpertemperatur durch die Umgebungstemperatur nach 6-AN Vergiftung

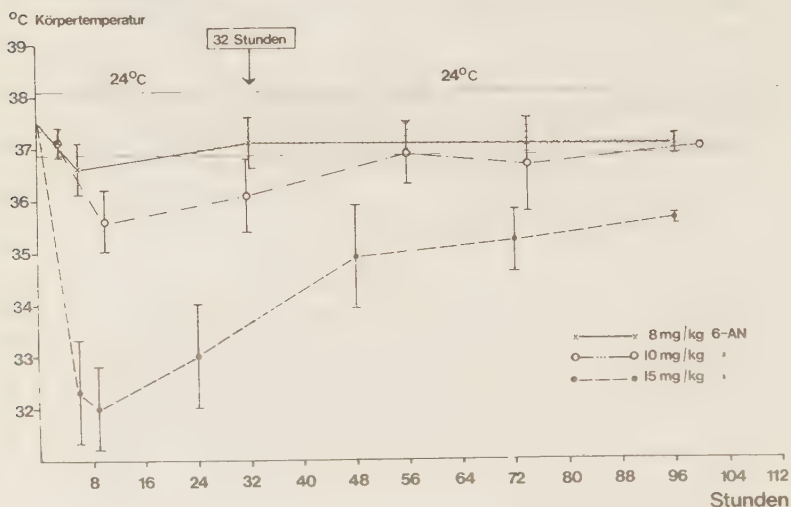


Abbildung 42: Bei einer Umgebungstemperatur von 24°C sinken die Körpertemperaturen der mit 6-AN behandelten Muttertiere - der Dosis entsprechend - stark ab. Das Maximum der Hypothermie liegt für die drei untersuchten Dosen nach etwa 8 Stunden Einwirkzeit.

Abbildung 43

Beeinflussung der Körpertemperatur durch die Umgebungstemperatur nach 6-AN Vergiftung

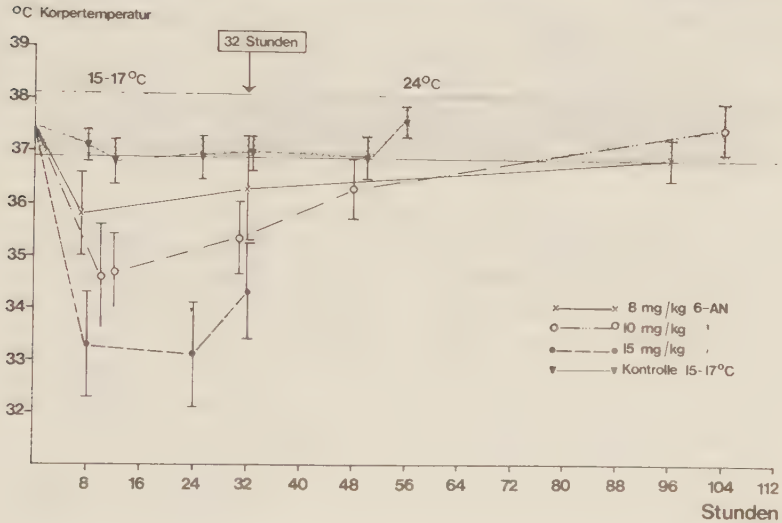


Abbildung 43: Bei einer Umgebungstemperatur von 15° - 17° C bleiben die unbehandelten Muttertiere an der unteren Grenze der normalen Körpertemperatur. Die Hypothermie der mit 6-AN behandelten Tiere ist bei 8 mg/kg und 10 mg/kg - gegenüber den bei 24° C gehaltenen Tieren - verstärkt. Die Körpertemperaturen kehren auch etwas langsamer zu den normalen Werten zurück.

Abbildung 44

Beeinflussung der Körpertemperatur durch die Umgebungstemperatur nach 6-AN Vergiftung

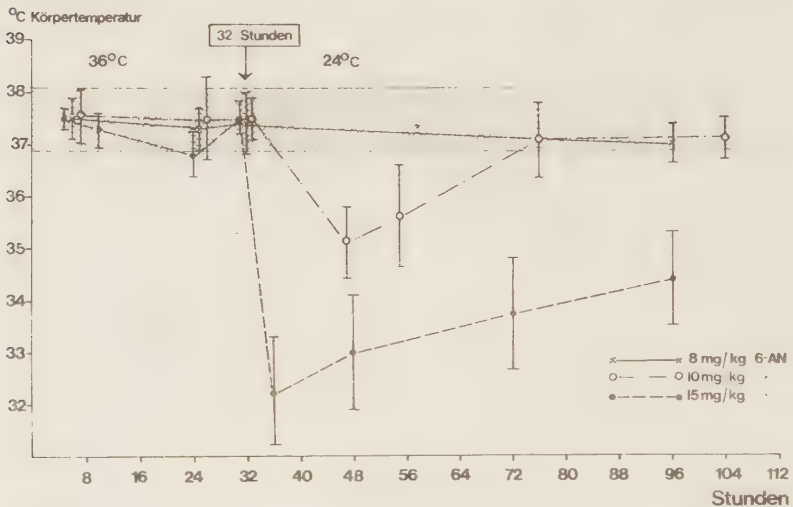


Abbildung 44: Die Muttertiere wurden nach der 6-AN-Injektion für 32 Stunden einer Umgebungstemperatur von 36°C ausgesetzt. Die Körpertemperaturen der mit 10 mg/kg bzw. 15 mg/kg behandelten Tiere sanken nach dem Inkubieren - bei einer Umgebungstemperatur von 24°C - stark ab und kehren relativ spät auf die normalen Werte zurück.

Die Abbildung 42 zeigt die von der 6-AN-Dosis abhängige Hypothermie bei einer Umgebungstemperatur von 24°C . Die tiefste durch 6-AN hervorgerufene Körpertemperatur ist bei allen drei Dosen nach ca. 8 Stunden erreicht.

Die Muttertiere, die nach der 6-AN-Injektion für 32 Stunden einer Temperatur von $15^{\circ} - 17^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt wurden, reagierten bei 8 mg/kg und 10 mg/kg 6-AN mit einer stärkeren Temperatursenkung und kehrten erst später auf die normale Körpertemperatur zurück (Abb. 43).

Ganz extrem war die Reaktion der mit 6-AN behandelten Tiere, deren Körpertemperatur durch die 36°C Umgebungstemperatur im Normbereich gehalten wurde. Nach 32 Stunden Aufenthalt im Inkubator sank die Körpertemperatur - einige Stunden später gemessen - auf Werte, die weit niedriger waren als die der anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt (Abb. 44). Bei diesen Gruppen war durch die längere toxische Wirkung des 6-AN auf die Muttertiere - angezeigt durch die nach Senkung der Umgebungstemperatur auftretende Hypothermie - auch eine stärkere 6-AN-Wirkung auf die Embryonen zu erwarten.

2.6.3.2. Gewichtskontrollen der Muttertiere

Die Gewichtszunahme bei schwangeren Tieren ist nur unter großen Vorbehalten für eine Beurteilung toxischer Wirkung des 6-AN auf die Muttertiere und deren Embryonen tauglich. Die Mäuse haben eine unterschiedliche Anzahl von Embryonen beziehungsweise eine unterschiedliche Resorptionsquote. Bei der Auswertung der gemessenen Gewichte wurden nur die Tiere berücksichtigt, die am Tag 18 mindestens 8 lebende Foeten hatten. Trotzdem streuten die Gewichts differenzen bei den Kontrolltieren und bei den mit 6-AN behandelten Muttertieren sehr (Tab. 23).

Tabelle 23

	15° - 17° C				24° C				36° C			
	32 Stunden								32 Std.		1o. Std.	
	6-AN	n	Kont.	n	6-AN	n	Kont.	n	6-AN	n	6-AN	n
n. 32 Std.	- 4,7 ± 1,3	6	+ 0,3 ± 0,9	6	- 4,1 ± 0,7	8	+ 0,5 ± 1,1	8	- 5,5 ± 0,95	6	- 3,6 ± 0,5	4
n. 12o Std.	+ 3,3 ± 2,9	6	+ 7,3 ± 3,8	6	+ 2,0 ± 3,3	8	+ 8,2 ± 2,1	8	+ 2,6 ± 2,5	6	+ 2,7 ± 2,3	4

	Std.	Ko/6-AN
15° - 17° C	32 12o	p < 0,0002 p < 0,1
24° C	32 12o	p < 0,0002 p < 0,0005

	6-AN	32 Std.	12o Std.
24° C 15° - 17° C		p < 0,2	Ø
24° C 36° C		p < 0,02	Ø

Tabelle 23: Die Muttertiere wurden am Tag 9 der Schwangerschaft mit 8 mg/kg 6-AN subcutan behandelt. Anschließend wurden die entsprechenden Tiergruppen für 32 Stunden den extremen Temperaturen 15° - 17° C bzw. 36° C ausgesetzt. Die Tabelle zeigt die Gewichts-differenzen der Muttertiere gegenüber den Ausgangsgewichten am Tag 9. Die mit 6-AN behandelten Muttertiere haben gegenüber den Kontrolltieren - unabhängig von der Umgebungstemperatur - nach 32 Stunden an Gewicht verloren.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Gewichtsverlust der Muttertiere durch 6-AN-Wirkung hervorgerufen wird und durch die unterschiedliche Umgebungstemperatur nicht beeinflußt wird. Rückschlüsse auf das Wachstum der Embryonen sind nur indirekt möglich und sehr unsicher. Weitaus genauer kann der Temperatureinfluß auf die embryonale Entwicklung durch teratologische Untersuchungen beurteilt werden.

2.6.3.3. Teratologie

.....

Die teratogene Substanz 6-AN ist an Mäusen besonders von PINSKY und FRASER (1960) und GOLDSTEIN et al. (1963) ausführlich untersucht worden. Je nach dem Schwangerschaftszeitpunkt konnten als Antwort auf die 6-AN-Behandlung verschiedene Mißbildungen induziert werden. Uns hat interessiert, ob die Körpertemperatur der mit 6-AN vergifteten Tiere, die mit Hilfe der Umgebungstemperatur bei den Muttertieren verändert werden kann, die teratogene Wirkung des 6-AN beeinflußt. Als Kriterien wurden das Feuchtwicht der lebenden Foeten, der Prozentsatz der Tiere mit Gaumenspalten und die Anzahl der Resorptionen in Prozent der gesamten Keimanlagen gewählt. Die Tabelle 24 zeigt die Mißbildungsrate bei Embryonen am Tag 18, deren Muttertiere am Tag 9 der Schwangerschaft mit 10 mg/kg 6-AN subcutan behandelt wurden.

Tabelle 24

	% der lebenden Foeten		% der Muttertiere mit mißgebildeten Foeten	
	n =		n =	
15° - 17° C 32 Stunden	8,9 %	47	20 %	5
24° C 32 Stunden	9,5 %	73	50 %	8
36° C 32 Stunden	27,0 %	69	50 %	6
36° C 10 Stunden	31,0 %	48	60 %	5

Tabelle 24: Nach der Sectio am Tag 18 wurden die Foeten in 10 %iger Formollösung fixiert und anschließend mit KOH behandelt. Das Skelett wurde mit Alizarin angefärbt.

Diese Zusammenstellung zeigt, daß die Toxizität des 6-AN mit der Erhöhung der Umgebungstemperatur der Muttertiere steigt.

Die Feuchtgewichte der lebenden Foeten am Tag 18 der Schwangerschaft und die Resorptionsrate sind in der folgenden Tabelle 25 zusammengefaßt.

Tabelle 25: Tag 9 der Schwangerschaft, 1 x 10 mg/kg 6-AN s.c.

		10 mg/kg 6-AN	Anz.d. Foeten	Kontrolle	Anz.d. Foeten	p
15°-17°C 32 Std.	Feuchtgew. Resorpt.	1,19 ± 0,17 6 %	47	1,26 ± 0,13 5 %	63	< 0,02
24°C	Feuchtgew. Resorpt.	1,0 ± 0,15 6,4 %	73	1,24 ± 0,12 Ø	98	< 0,0002
36°C 32 Std.	Feuchtgew. Resorpt.	1,01 ± 0,15 13,8 %	69			
36°C 10 Std.	Feuchtgew. Resorpt.	1,09 ± 0,22 9,25 %	49			

Die Muttertiere wurden am Tag 9 mit 10 mg/kg 6-AN behandelt. Am Tag 18 der Schwangerschaft wurden die Foeten durch eine Sectio gewonnen. Gaumenspalten sind zu diesem frühen Zeitpunkt der Behandlung nicht zu erwarten.

15° - 17° C / 24° C p < 0,0002

Die Foeten der mit 10 mg/kg 6-AN am Tag 9 behandelten Muttertiere, die für 32 Stunden bei einer Umgebungstemperatur von 15° - 17° C gehalten wurden, weisen - gegenüber den Kontrollfoeten - nur eine geringe Gewichtsdivergenz auf. Die Resorptionsquote ist bei beiden Versuchsgruppen gleich. Dagegen sind die Gewichte der Foeten, deren behandelte Muttertiere bei einer Umgebungstemperatur von 24° C bzw. 36° C gehalten wurden, hoch signifikant kleiner als die der Kontrollen (p < 0,0002). Da auch die Resorptionsquote mit der Erhöhung der Umgebungstemperatur ansteigt, besteht eine Abhängigkeit der toxischen Wirkung des 6-AN von der Umgebungstemperatur und damit von der Körpertemperatur der Muttertiere.

Um für die biochemischen Untersuchungen den empfindlichsten Bereich für eine Beeinflussung der 6-AN-Wirkung auf den Embryo durch eine Änderung der Umgebungstemperatur der Muttertiere zu finden,

wurden am Tag 10 der Schwangerschaft 6 mg/kg, 8 mg/kg bzw. 10 mg/kg 6-AN den Muttertieren subcutan injiziert. Die Tabelle 26 zeigt, daß sich sowohl dosisabhängig als auch temperaturabhängig die Toxizität des Antivitamins ändert. Besonders auffällig ist der Einfluß der Umgebungstemperatur auf die 6-AN-Wirkung bei 8 mg/kg am Tag 10. Bei 36° C, d.h. bei einer Umgebungstemperatur, bei der die Körpertemperatur nicht absinkt, steigt die Resorptionsquote um 200 % und die Zahl der Gaumenspalten von 2 % auf 19,5 %. Auch die für 32 Stunden bei 15° - 17° C gehaltenen Tiere zeigen einen Anstieg der Resorptionen und der Gaumenspalten.

In der Tabelle 27 ist die Versuchsserie zusammengefaßt, die am Tag 13 der Schwangerschaft durchgeführt wurde. Der Tag 13 ist der empfindlichste Zeitpunkt für das Erzeugen von Gaumenspalten bei Mäusen (GOLDSTEIN et al., 1963). Daher ist in dieser Tabelle neben dem Feuchtgewicht die Anzahl der Gaumenspalten ein empfindlicher Gradmesser für die Toxizität des 6-AN. Bei 15 mg/kg 6-AN nimmt die Zahl der Gaumenspalten mit steigender Außentemperatur zu.

Die Auswertung des Hungerversuchs zeigt die spezielle Empfindlichkeit der Embryonen des NMRI-Stammes gegenüber dem Nahrungsentzug bei den Muttertieren. Da die vergifteten Muttertiere - je nach Vergiftungsgrad - auch keine Nahrung aufnehmen, ist der Hunger der Muttertiere sicher ein zusätzlicher Effekt bei der Entstehung der Gaumenspalten.

2.6.3.4. Biochemische Untersuchungen

Für die biochemischen Untersuchungen wurden die Muttertiere am Tag 9.1/2 mit 8 mg/kg 6-AN subcutan behandelt. Nach 16 Stunden - am Tag 10 + 5 Stunden - wurden die Embryonen herauspräpariert und in das - unter Methoden beschriebene - In-vitro-System eingesetzt.

Tabelle 26: Tag 10 der Schwangerschaft, 1 x mit 6-AN behandelt.

			6 mg/kg	Mut- ter- tiere	Foe- ten	8 mg/kg	Mut- ter- tiere	Foe- ten	10 mg/kg	Mut- ter- tiere	Foe- ten	Kontrollen wie Tag 9	Mut- ter- tiere	Foe- ten	
	15° - 17° C 32 Std.	Gew. Res. GS				1,12 ± 0,2 12,7 % 18,4 %	9	76				1,26 ± 0,13 6 % Ø	6	63	
	24° C	Gew. Res. GS	1,3 ± 0,1 5,2 % 0 %	5	55	1,22 ± 0,13 9,1 % 2,0 %	9	100	0,95 ± 0,15 31,4 % 58,0 %	11	96	1,24 ± 0,12 Ø Ø	8	98	
	36° C 32 Std.	Gew. Res. GS	1,1 ± 0,05 12,4 % 1,5 %	7	65	1,03 ± 0,12 20,0 % 19,5 %	15	160	0,82 ± 0,19 41,0 % 43,0 %	7	49				

Tabelle 27: Tag 13 der Schwangerschaft, 1 x mit 6-AN behandelt.

		6-AN 10 mg/kg	Mut- ter- tiere n	Foe- ten n	6-AN 15 mg/kg	Mut- ter- tiere n	Foe- ten n	unbehandelt			Mut- ter- tiere n	Foe- ten n
								32 Std. Hunger	Mut- ter- tiere n	Foe- ten n		
15° - 17° C 32 Std.	Gew.	1,03 ± 0,15	8	86	0,96 ± 0,15	6	62				8	77
	Res.	10 %			10 %							
	GS	40,7 %			78 %							
24° C	Gew.	1,1 ± 0,2	5	39	0,97 ± 0,13	8	88	1,21 ± 0,12	6	52	8	98
	Res.	18,7 %			6,4 %			16,1 %				
	GS	56,5 %			85,0 %			17,3 %				
36° C 32 Std.	Gew.	1,06 ± 0,1	10	98	0,87 ± 0,09	6	64					
	Res.	10,9 %			7,25 %							
	GS	45,0 %			98,0 %							
		56 Std. 36° C										

Tabelle 28: Ergebnisse der biochemischen Untersuchung

	n	$\mu\text{g DNA}$ /Embryo	Glucose- Verbrauch $\text{pmole} \times \text{min}^{-1}$ $\times \mu\text{g DNA}^{-1}$	Lactat- Bildung $\text{pmole} \times \text{min}^{-1}$ $\times \mu\text{g DNA}^{-1}$	% Lactat v. Glucose	Lactat- Gehalt $\mu\text{mole} \times$ $\mu\text{g DNA}^{-1}$	dpm $\times \text{min}^{-1}$ $\times \mu\text{g DNA}^{-1}$	CO_2 $\text{pmole} \times$ μgDNA^{-1} $\times \text{min}^{-1}$	% CO_2 v. Glucose- Verbrauch
Kon- trolle	4	$63,2 \pm 8,4$	$48,3 \pm 1,7$	$86,0 \pm 7,7$	89,0	$3,55 \pm 0,2$	$9,85 \pm 0,94$	2,2	4,6
16°C	2	$71,6 \pm 8,4$	$55,5 \pm 11,7$ $p < 0,3$	$103,5 \pm 23,3$ $p = 0,2$	93,7	$3,1 \pm 0,1$ $p < 0,3$	$9,4 \pm 0,56$	2,1	3,8
24°C	4	$43,8 \pm 4,2$	$93,5 \pm 14,1$ $p < 0,0002$	$167,5 \pm 23,6$ $p < 0,001$	89,8	$2,1 \pm 0,2$ $p < 0,03$	$7,96 \pm 3,22$ $p < 0,3$	1,8	1,9
36°C	3	$44,4 \pm 5,0$	$134,9 \pm 10,7$ $p < 0,0002$	$227,7 \pm 32,6$ $p < 0,0002$	84,5	$2,33 \pm 0,5$ $p < 0,005$	$0,93 \pm 0,06$ $p < 0,0002$	0,2	0,15

Am Tag 10 der Schwangerschaft wurden die Muttertiere mit 8 mg/kg 6-AN s.c. behandelt. Anschließend wurden die behandelten Mäuse in drei Gruppen aufgeteilt und für 16 Stunden unterschiedlichen Umgebungstemperaturen ausgesetzt.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 28 zusammengefaßt. Auffällig ist die Abhängigkeit der Stoffwechselstörung von der Umgebungstemperatur der behandelten Muttertiere. Alle von uns bestimmten Parameter der Embryonen von Muttertieren, die für 16 Stunden bei 15° - 17° C gehalten wurden, entsprechen denen der Kontrolliembrionen. Bei einer Umgebungstemperatur der Muttertiere von 24° C zeigten die Embryonen eine verstärkte Stoffwechseländerung und eine - wenn auch nicht signifikante - Abnahme des DNA-Gehaltes. Signifikant gegenüber den Kontrollen ist der Anstieg im Glucose-Verbrauch ($p < 0,0002$) und die vermehrte Lactat-Bildung ($p < 0,001$). Der Lactat-Gehalt und die CO_2 -Bildung aus 1-C^{14} -markierter Glucose sind gegenüber den Kontrollen deutlich vermindert ($p < 0,03$ bzw. $p < 0,3$).

Sehr ausgeprägt ist das Vergiftungsbild bei der letzten Gruppe. Bei einer Umgebungstemperatur der behandelten Muttertiere von 36° C zeigen sich bei allen gemessenen Parametern (ausgenommen ist der DNA-Gehalt der Embryonen) hochsignifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollen. Der Glucose-Verbrauch und die Lactat-Bildung sind über das 200-fache angestiegen, während der Lactat-Gehalt der Embryonen nur 65,5 % der Kontrollen beträgt. Die gemessene CO_2 -Menge aus markierter Glucose fällt auf ca. 9 % der Kontrollen.

Da bei dieser Versuchsreihe der 6-P-G-Gehalt nicht bestimmt wurde, erlauben die CO_2 -Werte keine differenzierte Interpretation. Sie können - besonders bei der 36° -Gruppe - auf einen gegenüber den Kontrollen weitaus größeren 6-P-G-Pool hinweisen.

Besonders die Ergebnisse dieser biochemischen Untersuchungen zeigen den großen Einfluß der Umgebungstemperatur der Muttertiere auf die embryotoxische Wirkung des 6-AN. Das Vergiftungsbild der Embryonen der bei 36° C gehaltenen Tiere entspricht demjenigen, das bei einer höheren Dosis 6-AN erreicht wird, wie vergleichbare in-vitro-Versuche unserer Gruppe mit Rattenembryonen nach verschiedener Einwirkzeit und unterschiedlichen Dosen von

6-AN zeigten (KÖHLER, 1970; NEUBERT et al., 1970). Hierbei wurde aber auf die Körpertemperaturen der behandelten Tiere kein Einfluß genommen. Wenn nun durch die Veränderung der Körpertemperatur der behandelten Muttertiere ein stärkerer oder schwächerer Einbau des 6-AN in die Wasserstoff übertragenden Co-Fermente NAD^+ und besonders NADP^+ erreicht wird, müssen die Pyridin-Nucleotid synthetisierenden Fermente bzw. die NAD(P) -Glycohydrolase sehr temperatur-empfindliche Fermente sein. Die Körpertemperatur-Differenzen gegenüber den bei 36°C gehaltenen Tieren betrugen nach 7 Stunden bei der 16°C -Gruppe $1,7^\circ\text{C}$ und bei der 24°C -Gruppe nur $0,9^\circ\text{C}$. Ein Nachweis über eine höhere Konzentration der 6-AN-haltigen Antimetaboliten in dem embryonalen Gewebe muß noch - z.B. mit radioaktiv markiertem 6-AN - erbracht werden.

5. Programme zur mathematischen Bestimmung der Km-Werte und Vmax-Werte mit Standardabweichungen.

Für die Bestimmung der Parameter K_m und V_{max} einer Enzymkinetik wurde neben den graphischen Methoden auch eine statistische Berechnung durchgeführt. Die Rechenvorschrift wurde von WILKINSON (1961) übernommen und für das WANG-370-System programmiert. Die graphischen Methoden haben bei der Bestimmung der erwähnten Parameter erhebliche Nachteile: DOWD und RIGGS (1965) haben die drei linearen Transformationen $1/v$ gegen $1/s$, v gegen v/s und s/v gegen s kritisch untersucht. Sie haben Statistiken aufgestellt, inwieweit die durch die verschiedenen graphischen Methoden ermittelten K_m - und V_{max} -Werte mit den "wahren" Werten übereinstimmen. Am schlechtesten schnitt die Methode nach LINEWEAVER-BURK ab. Denn durch die reziproke Darstellung beider Variablen erhalten die kleinsten, mit den größten Fehlern behafteten Werte eine verhältnismäßig zu große Bedeutung für den Kurvenverlauf.

Die beiden anderen Transformationen sind wesentlich günstiger. Sie einmal nach der Graphik festgelegten Parameter K_m und V_{max} liegen aber nichts über die "Güte" der Messungen aus. Liegen

die Meßpunkte nicht präzise auf einer Geraden, kann es auch für den Geübten mehrere Lagemöglichkeiten und damit verschiedene Schnittpunkte mit der Abszisse bzw. Ordinate geben. WILKINSON (1961) hat die Kinetikstudien von ATKINSON et al. (1961) benutzt, um eine statistische Methode zu entwickeln. Hiermit können aus v und der dazugehörigen Substratkonzentration (s) die Werte K_m und V_{max} mit den Standardabweichungen errechnet werden. Hierdurch ergibt sich ein Maß für die Genauigkeit der Messung.

Es hat sich bei unseren Arbeiten bewährt, die vom Schreiber direkt ablesbaren Reaktionsgeschwindigkeiten sogleich nach der gebräuchlichen und schnellsten graphischen Methode - dem LINE-WEAVER-BURK-Diagramm - aufzuzeichnen. Hierdurch können z.B. Pipettierfehler und Substrathemmungen gleich bei der Messung erkannt und durch Wiederholung der betreffenden Messung ausgeschaltet werden. Wenn dann die Parameter für das Bezugssystem bekannt sind, können später mit Hilfe der Rechenprogramme die Quotienten für die verschiedenen graphischen Darstellungen ausgerechnet und die K_m - bzw. V_{max} -Werte mit ihren Abweichungen nach der statistischen Methode bestimmt werden.

3.1. Nicht-schreibende Programme

3.1.1. Nicht-schreibendes Programm 1 (1 Karte)

Dieses Programm errechnet aus dem Schreiberausschlag pro Minute (R) nach der Formel auf der Protokollrückseite die Reaktionsgeschwindigkeit v . Außerdem werden aus v und der dazugehörigen Substratkonzentration die Parameter $1/v$; $1/s$; s/v und v/s für die verschiedenen graphischen Auswertungen einer Enzymkinetik ausgerechnet. Sie können aus den Speichern abgerufen werden. Karte einlegen und die Werte von der Protokollrückseite eingeben.

Prime

1. Gesamtvolumen (ml)
continue
2. β = Faktor für die Umrechnung von % Schreiberausschlag/min
auf $\Delta E/\text{min}$ ohne Berücksichtigung der Verstärkung.
continue
3. Enzymverdünnung
continue
4. = Extinktionskoeffizient $\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{mol}}$
continue
5. Verstärkung
continue
6. Schichtdicke (cm)
continue
7. eingesetzte Enzymmenge (ml)
continue
8. "a" = Bezugssystem (mg/ml bzw. $\mu\text{g}/\text{ml}$)
continue

Aus den In die Maschine eingegebenen Werten wird ein Faktor (F) errechnet.

$$v = \frac{\text{Gesamtvolumen} \times \beta \times \text{Enzymverdünnung}}{e \times \text{Verstärkung} \times \text{Schichtdicke} \times \text{Enzymmenge} \times a} \times R$$

In einem Schleifenprogramm bestimmt nun die Rechenmaschine mit Hilfe des Faktors aus R und dem zugehörigen S die für die graphische Darstellung notwendigen Parameter v; 1/v; 1/s; s/v und v/s. Sie können aus den Stores abgerufen werden.

- R eingeben
continue
- S eingeben
continue

usw. alle S - und v-Werte abwechselnd eingeben.

Nach dem letzten v-Wert und continue: Bei zwei Kartenlesern die Karten 3 und 4 einlegen, bei vier Kartenlesern gleich continue.

Danach läßt sich abrufen:

Store 0	Km	(Dimension wie S)
Store 1	S.E.	(Km)
Store 2	Vmax	(Dimension wie v)
Store 3	S.E.	(Vmax)

Bei der Benutzung dieser drei genannten Programme hat es sich herausgestellt, daß sie für den Routinegebrauch noch recht umständlich sind. Daraufhin wurden die Programme zu "schreibenden" Programmen erweitert. Es steht eine Teletype und ein Datentenspeichergerät zur Verfügung, das die fortlaufenden Wertepaare speichert und aus dem - in der gleichen Reihenfolge - programmiert diese wieder abgerufen werden. Bei den neuen Programmen wird, analog zu den alten, zuerst der Faktor F bestimmt. Nach der Eingabe der Korrekturfaktoren für (R x F) und S werden nur noch die Anzahl der Werte-Paare n und die Wertepaare selbst nacheinander in die Maschine gegeben. Auf dem ausgedruckten Formblatt sind die eingegebenen Zahlenwerte kontrollierbar ausgedruckt, sowie die Parameter für die verschiedenen graphischen Darstellungen und die statistisch ermittelten Km- und Vmax-Werte mit ihren Abweichungen ersichtlich.

Enzympräparation

Anzahl der Organe : _____
 Anzahl der Embryonen : _____
 Gewicht : _____

Homogenisieren

homogenisiert in : _____
 aufgefüllt auf ml : _____
 Homogenisator : _____
 Geschwindigkeit : _____
 Anzahl der Hom. Bewegungen : _____

Spinco

Geschwindigkeit rpm
 Dauer min
 Rotor

Substr.u. Co-Substr.	mg	ml	gelöst in	Endkonz. in Küv. bel: ml in ml

- 1. Gesamtvolumen ml
2. BFaktor für Umrechn. v. %Ausschlag/min auf ΔE /min Eppendorf:0,01
 Leitz Un :0,02
3. Enzymverdünnung (.....fach)
4. Extinktionskoeffizient = ϵ
5. Verstärkung (.....mal) $\epsilon \left[\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{Mol}} \right]$ = Extinktion einer mM Lösung
6. Schichtdicke
7. Enzymmenge ml
 8. "a" für Bezugssystem:
 Protein (mg/ml)
 Stickstoff (mg/ml) in der benutzten
 DNA bzw. RNA ($\mu\text{g/ml}$) Enzympräparation

$$v = F \times R \left(\frac{\mu\text{mole}}{\text{min} \times \text{mg}} \right)$$

$$v = \frac{\text{Gesamtvolumen} \times B \times \text{Enzym. Verd.}}{\epsilon \times \text{Verstärk.} \times \text{Schichtd.} \times \text{Enzymmenge} \times a} \times R$$

Bestimmung d. Substratkonzentration "c"

$$c = \frac{\% \text{ Ausschlag} \times B}{\epsilon \times \text{Schichtd.} \times \text{Verstärk.}}$$

c = bei eingesetztem Volumen ml der Substratlösung
 in ml Gesamtvolumen

$$R = \% \text{ Ausschlag/min}$$

3.2. Schreibende Programme 501, 502, 503

für WANG 370 System und Teletype

(Data storage 373 und 3 bzw. 5 Kartenleser)

501 Dieses Programm errechnet die gängigen Parameter, die für eine graphische oder rechnerische Auswertung der Enzymkinetik benötigt werden.

1. Errechnen des Faktors F, mit dem der abgelesene Schreiberausschlag pro min (R) in v umgerechnet werden kann.

$$F \times R = v$$

2. v - Korrektur denn F x R muß sein $\begin{matrix} < 10 \\ > 0,1 \end{matrix}$

3. s - Korrektur denn s muß sein $\begin{matrix} < 10 \\ > 0,1 \end{matrix}$

4. Ausdrucken von R; v; $\frac{1}{v}$; s ; $\frac{1}{s}$; $\frac{v}{s}$; $\frac{s}{v}$

5. Speichern von n (Anzahl der Meßwerte); s und v fortlaufend als Wertpaare.

502 Aus den gespeicherten Werten für n; s ; v werden mathematisch nach WILKINSON (1961) K_m^O und V_{max}^O als vorläufige Größen bestimmt und ausgedruckt.

503 Das Programm berechnet nach WILKINSON (1961) aus den gespeicherten Werten für K_m^O ; V_{max}^O ; n; v; s die genauen K_m und V_{max} Werte mit den Standardabweichungen.

I Programm 501 (5 Karten)

Das angegebene Programm kann auch mit 3 Kartenlesern durchgeführt werden.

5 Karten bzw. die ersten 3 Karten in der nummerierten Reihenfolge einlegen.

Prime

Continue

(Druckt Text aus, siehe Beispiel auf S.51ff).

1.

Continue

2.

Continue

3.

Continue

8.

Continue

(Druckt das rechnerische Ergebnis für F aus).

F ist der Umrechnungsfaktor $F \times R = v$.

Korrekturfaktor für v ermitteln, denn $F \times R = v$

muß sein < 10
 $> 0,1$

Die Voraussetzung muß deshalb eingehalten werden, weil die WANG-Rechenmaschine für die folgenden Programme, in denen Potenzierungen enthalten sind, nur über eine begrenzte Anzahl von Rechenstellen verfügt.)

Ist die oben genannte Voraussetzung gegeben:

Korrekturfaktor = 1

Sonst die Dezimalstelle durch den Korrekturfaktor so verschieben, daß die Voraussetzung zutrifft.

Continue

Korrekturfaktor für v eingeben (z.B. 0,01 bei "v 10-999;
od. 1000 bei "v 0,0001-0,009").

Continue

(Auc die s-Werte müssen korrigiert werden

s muß sein: ≤ 10
 $> 0,1$).

Korrekturfaktor für s eingeben

(Wird über der s -Säule in Klammern ausgedruckt.

Nur die gespeicherten Werte sind entsprechend korrigiert.

Die ausgedruckten s -Werte und K_m -Werte haben den richtigen Stellenwert.)

Druckt Überschrift: $R; v; \frac{1}{v}; s; \frac{1}{s} \dots$

Bei 3 Karten lesern: Die Karten I bis III herausnehmen
und die Karten IV und V einlegen.

Bei 5 Kartenlesern gleich:

Continue

Druckt die Überschrift zu Ende $\dots \frac{s}{v}; \frac{v}{s}$

Druckt die Rechensymbole (Multiplikation bzw. Division)

unter $v; \frac{1}{v}; \frac{s}{v}; \frac{v}{s}$

Druckt den Korrekturfaktor für v -Werte noch einmal aus.

Wichtig für die graphischen Darstellungen:

Die ausgedruckten Werte für $v; \frac{1}{v}; \frac{s}{v}; \frac{v}{s}$ sind um den Korrekturfaktor für v zu groß bzw. zu klein. Sie müssen daher noch mit dem darüber gedruckten Wert multipliziert oder dividiert werden!

(Beachte Symbole unter der Überschrift.)

n n = Anzahl der Werte-Paare
 n darf nur sein ≤ 8

Continue

s s und R als Werte-Paare jeweils
nach Beenden des Druckes eingeben.

Continue

R

Korrekturmöglichkeit für falsches Eingeben der Zahlen
für $n; s; R$:

a) vertippt ohne Continue

Clear Display und richtige Zahl eingeben

b) vertippt und Continue

Search 02 und mit n wieder beginnen.

ii Programm 502 (3 Karten)

Berechnet nach WILKINSON (1961) die vorläufigen Werte für K_m^O und V_{max}^O
3 Karten einlegen

Prime

Continue

Das Programm ruft n; s und v automatisch aus den Speichern ab.

Es werden die Werte für K_m^O (KM)
und V_{max}^O (VMAX)
ausgedruckt)

iii Programm 503 (5 Karten)

Berechnet nach WILKINSON (1961) die Werte für

K_m ; S.E. (K_m)

V_{max} ; S.E. (V_{max})

Das angegebene Programm kann auch mit 3 Kartenlesern durchgeführt werden.

5 Karten einlegen bzw. die ersten 3 Karten (wenn nur 3 Kartenleser zur Verfügung stehen)

Prime

Continue

Bei 3 Kartenlesern: Die Karten I bis III
herausnehmen und die
Karten IV und V einlegen.

Bei 5 Kartenlesern gleich:

Continue

(Das Programm ruft n; K_m^O ; V_{max}^O ; s und v automatisch ab.

Es werden K_m ; S.E. (K_m) V_{max} ; S.E. (V_{max}) ausgedruckt.

Da die Korrekturfaktoren für v (beeinflusst nur V_{max} und S.E. (V_{max})) und für s (beeinflusst nur K_m und S.E. (K_m)) berücksichtigt wurden:

K_m = in der Größenordnung s

V_{max} μ mole x mg Protein⁻¹ x min⁻¹, wenn s mM
und das Bezugssystem mg Pr/ml.

3.3. Model 370 Program 101

Verify Program
1498

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Enter	41	← 1. Ges. Vol.	40	Rec.0	14	
01	Stop	01		41	Enter	41	
02	Enter	41	← 2. B	42	Rec.2	16	
03	Stop	01	← 3. Enzymverd.	43	x=	46	
04	Enter	41		44	St.dir.	26	
05	Stop	01		45		50	→ $\frac{v}{s}$
06	≠	47	← 4. ε	46	Search	02	
07	Enter	41		47	1	61	
08	Stop	01	← 5. Verstärkg.	48			
09	≠	47		49			
10	Enter	41		50			
11	Stop	01		51			
12	≠	47	← 6. Schichtd.	52			
13	Enter	41		53			
14	Stop	01		54			
15	≠	47	← 7. einges. Enzymm.	55			
16	Enter	41		56			
17	Stop	01		57			
18	≠	47	← 8. a	58			
19	x=	46		59			
20	+AR	52	← Faktor	60			
21	Mark	07		61			
22	1	61		62			
23	Stop	01	← R	63			
24	Enter	41		64			
25	Rec. AR	51		65			
26	x=	46		66			
27	St. 0	10	→ v	67			
28	≠	47		68			
29	St. 1	11	→ $\frac{1}{v}$	69			
30	Cl AL	54		70			
31	Stop	01	→ s	71			
32	+AL	56		72			
33	≠	47		73			
34	St. 2	12	→ $\frac{1}{s}$	74			
35	Rec. AL	55		75			
36	Enter	41		76			
37	Rec. 1	15		77			
38	x=	46		78			
39	St. 3	13	→ $\frac{s}{v}$	79			

Wang Program No. 102

1

Verify Program
3180

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
-----	-----	------	---------	-----	-----	------	---------

00	+AL	56	← n	40	+AR	52	
01	0	60		41	St.Dir.	26	
02	St.Dir.	26		42	2	62	x ²
03	1	61		43	CI AR	50	
04	St.Dir.	26		44	Rec.1	15	
05	2	62		45	Enter	41	
06	St.Dir.	26		46	Rec.3	17	
07	3	63		47	x=	46	
08	St.Dir.	26		48	+AR	52	
09	4	64		49	Rec.Dir.	27	
10	St.Dir.	26		50	3	63	
11	5	65		51	+AR	52	
12	Mark	07		52	St.Dir.	26	
13	1	61		53	3	63	vy
14	Stop	01		54	CI AR	50	
15	St. 0	10	← s	55	Rec. 2	16	
16	Stop	01		56	Enter	41	
17	St. 1	11	← v	57	Rec. 3	17	
18	x ²	45		58	x=	46	
19	St. 2	12		59	+AR	52	
20	Enter	41		60	Rec.Dir.	27	
21	Rec. 0	14		61	4	64	
22	÷=	47		62	+AR	52	
23	St. 3	13		63	St.Dir.	26	
24	Rec. 1	15	y	64	4	64	xy
25	Enter	41		65	CI AR	50	
26	Rec. 2	16		66	Rec. 3	17	
27	x=	46		67	x ²	45	
28	+AR	52		68	+AR	52	
29	Rec.Dir.	27		69	Rec.Dir.	27	
30	1	61		70	5	65	
31	+AR	52		71	+AR	52	
32	St.Dir.	26		72	St.Dir.	26	
33	1	61		73	5	65	y ²
34	CI AR	50	vx	74	CI AR	50	
35	Rec. 2	16		75	1	61	
36	x ²	45		76	-AL	57	
37	+AR	52		77	Test zero	30	
38	Rec.Dir.	27		78	Search	02	
39	2	62		79	1	61	

Wang Program No. 102

11

Verify Program
2172

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Rec.Dir.	27		40	x=	46	
01	i	61		41	+AR	52	
02	Enter	41		42	Rec.Dir.	27	
03	Rec.Dir.	27		43	4	64	
04	5	65		44	x ²	54	
05	x=	46		45	-AR	53	
06	+AR	52		46	Enter	41	
07	Rec.Dir.	27		47	Rec. 0	14	
08	3	63		48	±=	47	
09	Enter	41		49	St. 0	10	→ V _{mar} ⁰
10	Rec.Dir.	27		50	Cl AR	50	
11	4	64		51	Stop	01	
12	x=	46		52			
13	-AR	53		53			
14	St. 0	10	Δ	54			
15	Cl AR	50		55			
16	Rec.Dir.	27		56			
17	2	62		57			
18	Enter	41		58			
19	Rec.Dir.	27		59			
20	3	63		60			
21	x=	46		61			
22	+AR	52		62			
23	Rec.Dir.	27		63			
24	1	61		64			
25	Enter	41		65			
26	Rec.Dir.	27		66			
27	4	64		67			
28	x=	46		68			
29	-AR	53		69			
30	Enter	41		70			
31	Rec. 0	14		71			
32	±=	47		72			
33	St. 1	11	← km ⁰	73			
34	Cl AR	50		74			
35	Rec.Dir.	27		75			
36	2	62		76			
37	Enter	41		77			
38	Rec.Dir.	27		78			
39	5	65		79			

Wang Program No. 103

1

Verify Program
3318

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	+AL	56	← n	40	Mark	07	
01	0	60		41	1	61	
02	St.Dir.	26		42	Stop	01	
03		60		43	+AR	52	← s
04	Rec. AL	55		44	St. 0	10	s
05	St.Dir.	26		45	Rec.Dir.	27	
06		60		46		61	
07	0	60		47	+AR	52	
08	St.Dir.	26		48	St. 1	11	s+km ⁰
09		61		49	x ²	45	
10		26		50	St. 2	12	(s+km ⁰) ²
11		62		51	Cl AR	50	
12		26		52	Rec.Dir.	27	
13		63		53		62	
14		26		54	Enter	41	
15		64		55	Rec. 0	14	
16		26		56	x=	46	
17		65		57	St. 3	13	v ⁰ s
18		26		58	Enter	41	
19		66		59	Rec. 1	15	
20		26		60	±=	47	
21		67		61	St. 0	10	f
22		26		62	+AR	52	
23		70		63	Rec.Dir.	27	
24		26		64		63	
25		71		65	+AR	52	
26		26		66	St.Dir.	26	
27		72		67		63	Σf
28		26		68	Cl AR	50	
29		73		69	Rec. 0	14	
30		26		70	x ²	45	
31		74		71	+AR	52	
32	Stop	01		72	Rec.Dir.	27	
33	St.Dir.	26	← km ⁰	73		64	
34		61		74	+AR	52	
35	x=	46		75	St.Dir.	26	
36	Stop	01	← v _{max} ⁰	76		64	Σf ²
37	St.Dir.	26		77	Cl AR	50	
38	62	62		78	Rec. 3	17	
39	x=	46		79	Change signe	77	

Wang Program No. 103

11

Verify Program
3187

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Enter	41		40		70	$\Sigma v f$
01	Rec. 2	16		41	CI AR	50	
02	$\pm$	47		42	Rec. 2	16	
03	St. 1	11	f'	43	Enter	41	
04	+AR	52		44	Rec. 1	15	
05	Rec.Dir.	27		45	x=	46	
06		65		46	+AR	52	
07	+AR	52		47	Rec.Dir.	27	
08	St. Dir.	26		48		71	
09		65	$\Sigma f'$	49	+AR	52	
10	CI AR	50		50	St.Dir.	26	
11	Rec. 1	15		51		71	$\Sigma v f'$
12	x^2	45		52	CI AR	50	
13	+AR	52		53	Rec. 0	14	
14	Rec.Dir.	27		54	Enter	41	
15		66		55	Rec. 1	15	
16	+AR	52		56	x=	46	
17	St.Dir.	26		57	+AR	52	
18		66	$\Sigma f t^2$	58	Rec.Dir.	27	
19	CI AR	50		59		72	
20	x=	46		60	+AR	52	
21	Stop	01		61	St.Dir.	26	
22	St. 2	12	$\leftarrow v$	62		72	$\Sigma f f'$
23	x^2	45		63	CI AR	50	
24	+AR	52		64	1	61	
25	Rec.Dir.	27		65	-AL	57	
26		67		66	Test zero	30	
27	+AR	52		67	Search	02	
28	St.Dir.	26		68	1	61	
29		67	Σv^2	69	Rec.Dir.	27	
30	CI AR	50		70		64	
31	Rec. 2	16		71	Enter	41	
32	Enter	41		72	Rec.Dir.	27	
33	Rec. 0	14		73		66	
34	x=	46		74	x=	46	
35	+AR	52		75	St. 0	10	
36	Rec.Dir.	27		76	Stop	01	
37		70		77			
38	+AR	52		78			
39	St.Dir.	26		79			

Wang Program No. 103

111

Verify Program
3429

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Rec. 0	14		40	-AR	53	
01	+AR	52		41	Enter	41	
02	Rec.Dir.	27		42	Rec. 0	14	
03		72		43	+=	47	
04	x ²	45		44	St. 2	12	b ₂
05	-AR	53		45	Cl AR	50	
06	St. 0	10	Δ	46	Enter	41	
07	Cl AR	50		47	Rec. 1	15	
08	Rec.Dir.	27		48	+=	47	
09		66		49	+AR	52	
10	Enter	41		50	Rec.Dir.	27	
11	Rec.Dir.	27		51		61	
12		70		52	+AR	52	
13	x=	46		53	St. Dir.	26	
14	+AR	52		54		73	km
15	Rec.Dir.	27		55	Cl AR	50	
16		72		56	Rec. 1	15	
17	Enter	41		57	Enter	41	
18	Rec.Dir.	27		58	Rec.Dir.	27	
19		71		59		62	
20	x=	46		60	x=	46	
21	-AR	53		61	St. Dir.	26	
22	Enter	41		62		74	v
23	Rec. 0	14		63	Cl AR	50	
24	+=	47		64	Rec.Dir.	27	
25	St. 1	11	b ₁	65		67	
26	Cl AR	50		66	+AR	52	
27	Rec.Dir.	27		67	Rec. 1	15	
28		64		68	Enter	41	
29	Enter	41		69	Rec.Dir.	27	
30	Rec.Dir.	27		70		70	
31		71		71	x=	46	
32	x=	46		72	-AR	53	
33	+AR	52		73	Rec. 2	16	
34	Rec.Dir.	27		74	Enter	41	
35		72		75	Rec.Dir.	27	
36	Enter	41		76		71	
37	Rec.Dir.	27		77	x=	46	
38		70		78	-AR	53	
39	x=	46		79	St. 2	12	

Verify Program
2075

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	CI AR	50		40	✓	44	
01	Rec.Dir.	27		41	Enter	41	
02		60		42	Rec.AR	51	
03	+AR	52		43	x=	46	
04	2	62		44	St. 3	13	→ S.E.(v)
05	-AR	53		45	CI AR	50	
06	≠	47		46	Rec.Dir.	27	
07	Enter	41		47		73	
08	Rec. 2	16		48	St. 0	10	→ km
09	x=	46		49	Rec.Dir.	27	
10	✓	44		50		74	
11	St. 2	12	s	51	St. 2	12	V _{max}
12	CI AR	50		52	Stop	01	
13	Rec. 2	16		53			
14	Enter	41		54			
15	Rec. 1	15		55			
16	≠	47		56			
17	+AR	52		57			
18	Rec.Dir.	27	Σf ²	58			
19		64		59			
20	Enter	41		60			
21	Rec. 0	14	Δ	61			
22	≠	47		62			
23	✓	44		63			
24	Enter	41		64			
25	Rec. AR	51		65			
26	x=	46		66			
27	St. 1	11	→ S.E.(km)	67			
28	CI AR	50		68			
29	Rec.Dir.	27		69			
30		62		70			
31	Enter	41		71			
32	Rec. 2	16		72			
33	x=	46		73			
34	+AR	52		74			
35	Rec.Dir.	27		75			
36		66		76			
37	Enter	41		77			
38	Rec. 0	14		78			
39	≠	47		79			

Schreibendes Programm 501

1

Verify Program
2652

Prime

Continue

(Druckt Text aus)

1. → 1. →

2. → 2. →

3. → 3. →

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Write 1	24		40	Write 2	25	
01	CR	71		41	M	15	
02	Write 1	24		42	Write 2	25	
03	Print on	72		43	:	72	
04	Write 2	25		44	Write 1	24	
05	E	05		45	CR/LF	71	
06	Write 2	25		46	Write 1	24	
07	N	16		47	LF	70	
08	Write 2	25		48	Write 2	25	
09	Z	32		49	1	61	
10	Write 2	25		50	Write 2	25	
11	Y	31		51	.	56	
12	Write 2	25		52	Stop	01	← 1.
13	M	15		53	Write 1	24	
14	Write 2	25		54	DP	42	
15	:	72		55	Write 1	24	
16	Write 1	24		56	CR	71	
17	Space	67		57	Enter	41	
18	Write 2	25		58	Write 1	24	
19	O	17		59	Print on	72	
20	Write 2	25		60	Write 2	25	
21	R	22		61	2	62	
22	Write 2	25		62	Write 2	25	
23	G	07		63	.	56	
24	Write 2	25		64	Stop	01	
25	A	01		65	Write 1	24	← 2.
26	Write 2	25		66	DP	42	
27	N	16		67	Write 1	24	
28	Write 2	25		68	CR	71	
29	:	72		69	Enter	41	
30	Write 1	24		70	Write 1	24	
31	Space	67		71	Print on	72	
32	Write 2	25		72	Write 2	25	
33	D	04		73	3	63	
34	Write	25		74	Write 2	25	
35	A	01		75	.	56	
36	Write 2	25		76	Stop	01	← 3.
37	T	24		77	Write 1	24	
38	Write 2	25		78	DP	42	
39	U	25		79	Write 1	24	

Verify Program
3199

4. → 4.
5. → 5.
6. → 6.
7. → 7.
8. → 8.

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	CR	71		40	Enter	41	
01	Enter	41		41	Write 1	24	
02	Write 1	24		42	Print on	72	
03	Print on	72		43	Write 2	25	
04	Write 2	25		44	7	67	
05	4	64		45	Write 2	25	
06	Write 2	25		46	.	56	
07	.	56		47	Stop	01	
08	Stop	01	← 4.	48	Write 1	24	← 7.
09	Write 1	24		49	DP	42	
10	DP	42		50	Write 1	24	
11	Write 1	24		51	CR	71	
12	CR	71		52	*=	47	
13	*=	47		53	Enter	41	
14	Enter	41		54	Write 1	24	
15	Write 1	24		55	Print on	72	
16	Print on	72		56	Write 2	25	
17	Write 2	25		57	8	70	
18	5	65		58	Write 2	25	
19	Write 2	25		59	.	56	
20	.	56		60	Stop	01	
21	Stop	01	← 5.	61	Write 1	24	← 8.
22	Write 1	24		62	DP	42	
23	DP	42		63	Write 1	24	
24	Write 1	24		64	CR	71	
25	CR	71		65	Write 1	24	
26	*=	47		66	LF	70	
27	Enter	41		67	*=	47	
28	Write 1	24		68	x=	46	
29	Print on	72		69	Write 1	24	
30	Write 2	25		70	Print on	72	
31	6	66		71	Write 2	25	
32	Write 2	25		72	F	06	
33	.	56		73	Write 2	25	
34	Stop	01		74	=	75	
35	Write 1	24	← 6.	75	Write 1	24	
36	DP	42		76	DP	42	
37	Write 1	24		77	Write 1	24	
38	CR	71		78	Print on	72	
39	*=	47		79	Write 2	25	

Schreibendes Programm 501

111

	No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
Verify Program 2989	00	X	30		40	Write 1	24	
	01	Stop	01	→ Faktor	41	Space	61	
	02	Enter	41	→ Kontrolle	42	Write 1	24	
	03	Stop	01	← Korrektur-	43	Print on	72	
	04	Write 1	24	← faktor f.F	44	Write 2	25	
Korrekturfaktor für F (beeinflußt nur V) im St.dir. 32	05	DP	22		45	R	22	
	06	St.dir.	26		46	Write 1	24	
	07		32		47	Space	64	
	08	x=	46		48	Write 1	24	
	09	Write 1	24		49	Print on	72	
F korrigiert in St.dir. 76	10	Print on	72		50	Write 2	25	
	11	Write 2	25		51	V	26	
	12	=	75		52	Write 1	24	
	13	Write 1	24		53	Space	64	
	14	DP	23		54	Write 1	24	
	15	St.dir.	26	→ F korrigl.	55	Print on	72	
	16		76		56	Write 2	25	
	17	Write 1	24		57	1	61	
	18	CR	71		58	Write 2	25	
	19	Write 1	24		59	/	57	
	20	LF	70		60	Write 2	25	
	21	Write 1	24		61	V	26	
	22	Space	67		62	Write 1	24	
	23	Write 1	24		63	Space	64	
	24	Space	66		64	Write 1	24	
	25	Write 1	24		65	Print on	72	
	26	Print on	72		66	Write 2	25	
	27	Write 2	25		67	S	23	
	28	C	50		68	Write 1	24	
	29	Stop	01	← Korrektur-	69	Space	64	
Korrekturfaktor für S-Werte (beeinflußt nur S-Werte, die in den St.dir. gespei- chert werden). Faktor wird daher in Klam- mern ausgedruckt.	30	St.dir.	26	← faktor f.S	70	Write 1	24	
	31		41	← in Store	71	Print on	72	
	32	Write 1	24		72	Write 2	25	
	33	DP	22		73	1	61	
	34	Write 1	24		74	Write 2	25	
	35	Print on	72		75	/	57	
	36	Write 2	25		76	Write 2	25	
	37	)	51		77	S	23	
	38	Write 1	24		78	Stop	01	
	39	CR	71		79			

Schreibendes Programm 501

IV

Verify Program
3185

n für Werte-Paare
≤ 8
in St.dir. 42

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Write 1	24		40	Write 1	24	
01	Space	64		41	Print on	72	
02	Write 1	24		42	Write 2	25	
03	Print on	72		43	X	30	
04	Write 2	25		44	Write 1	24	
05	S	23		45	Space	66	
06	Write 2	25		46	Write 1	24	
07	/	57		47	Print on	72	
08	Write 2	25		48	Write 2	25	
09	V	26		49	:	72	
10	Write 1	24		50	Write 1	24	
11	Space	65		51	CR	71	
12	Write 1	24		52	Write 1	24	
13	Print on	72		53	Space	63	
14	Write 2	25		54	Rec.dir.	27	
15	V	26		55		32	(Korrekturf.f.F)
16	Write 2	25		56	Write 1	24	
17	/	57		57	DP	22	
18	Write 2	25		58	Mark	07	
19	S	23		59	2	62	
20	Write 1	24		60	Write 1	24	
21	CR	71		61	CR	71	
22	Write 1	24		62	Write 1	24	
23	Space	66		63	LF	70	
24	Write 1	24		64	Rec.ind.	33	
25	Print on	72		65	Row set2	22	
26	Write 2	25		66	Cl.displ.	76	
27	:	72		67	Rec.ind.	33	
28	Write 1	24		68	Col.set1	01	
29	Space	64		69	Cl.displ.	76	
30	Write 1	24		70	Cl.AR	50	
31	Print on	72		71	Cl.AL	54	
32	Write 2	25		72	Stop	01	
33	X	30		73	St.dir.	26	← n
34	Write 1	24		74		42	
35	Space	67		75	+ AR	52	
36	Write 1	24		76	Mark	07	
37	Space	67		77	1	61	
38	Write 1	24		78	Stop	01	
39	Space	61		79	+ AL	56	← S

Schreibendes Programm 501

V

Verify Program
2795

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Enter	41		40	Print on	72	
01	Rec.dir.	27		41	Write 2	25	
02		41		42	/	57	
03	X=	46		43	Write 1	24	
04	St.ind.	32		44	DP	22	
05	Row -	62		45	Rec. AL	55	S
06	Stop	01		46	Enter	41	$\frac{1}{v}$
07	Write 1	24	← R	47	Rec 1	15	$\frac{1}{v}$
08	DP	11		48	X=	46	$\frac{s}{v}$
09	Enter	41		49	St. 3	13	→ $\frac{s}{v}$
10	Rec.dir.	27		50	Write 1	24	
11		76		51	Print on	72	
12	X=	46		52	Write 2	25	
13	St.0	10	v	53	/	57	
14	Write 1	24		54	Write 1	24	
15	Print on	72		55	DP	23	
16	Write 2	25		56	Rec 0	14	v
17	/	57		57	Enter	41	$\frac{1}{s}$
18	Write 1	24		58	Rec 2	16	$\frac{1}{s}$
19	DP	12		59	X=	46	
20	Write 1	24		60	St.dir.	26	
21	Print on	72		61		50	→ $\frac{v}{s}$
22	Write 2	25		62	Write 1	24	
23	/	57		63	Print on	72	
24	St.ind.	32	v	64	Write 2	25	
25	Rowcol.+	60		65	/	57	
26	≠	47		66	Write 1	24	
27	St.1	11	→ $\frac{1}{v}$	67	DP	23	
28	Write 1	24		68	Write 1	24	
29	DP	22		69	CR	71	
30	Write 1	24		70	Cl AL	54	
31	Print on	72		71	1	61	
32	Write 2	25		72	-AR	53	
33	/	57		73	Test 0	30	
34	Rec AL	55	s	74	Search	02	
35	Write 1	24		75	1	61	
36	DP	12		76	Stop	01	
37	≠	47		77			
38	St. 2	12	→ $\frac{1}{s}$	78			
39	Write 1	24		79			

Schreibendes Programm 502

Verify Program
3282

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	0	60		40	+ AR	52	
01	St.dir.	26		41	Rec.dir.	27	
02	61	61		42	1	61	
03	St.dir.	26		43	+ AR	52	
04	62	62		44	St.dir.	26	
05	St.dir.	26		45	1	61	(v . x)
06	63	63		46	Cl.AR	50	
07	St.dir.	26		47	Rec.2	16	
08	64	64		48	x ²	45	
09	St.dir.	26		49	+ AR	52	
10	65	65		50	Rec.dir.	27	
11	Rec.Ind.	33		51	2	62	
12	Row set2	22		52	+ AR	52	
13	Cl.displ.	76		53	St.dir.	26	
14	Rec.Ind.	33		54	2	62	
15	Col.set1	01		55	Cl.AR	50	
16	Cl.displ.	76		56	Rec 1	15	
17	Rec.dir.	27		57	Enter	41	
18	42	↔(n)		58	Rec. 3	17	
19	+ AL	56		59	x=	46	
20	Cl.displ.	76		60	+ AR	52	
21	Mark	07		61	Rec.dir.	27	
22	3	63		62	3	63	
23	Rec.dir.	33 ↔(s)		63	+ AR	52	
24	- Row	62		64	St.dir.	26	
25	St. 0	10		65	3	63	
26	Cl.displ.	76		66	Cl AR	50	
27	Rec.ind.	33		67	Rec. 2	16	
28	Row col±	60 ↔(v)		68	Enter	41	
29	St. 1	11		69	Rec. 3	17	
30	x ²	45		70	x=	46	
31	St. 2	12		71	+ AR	52	
32	Enter	41		72	Rec.dir.	27	
33	Rec. 0	14		73	4	64	
34	±=	47		74	+ AR	52	
35	St. 3	13		75	St.dir.	26	
36	Rec. 1	15		76	4	64	
37	Enter	41		77	Cl AR	50	
38	Rec. 2	16		78	Rec. 3	17	
39	x=	46		79	x ²	45	

Schreibendes Programm 502

11

Verify Program
3381

No.	Cmd	Code	Comment†	No.	Cmd	Code	Comment†
00	+ AR	52		40		64	
01	Cl.displ.	76		41	x=	46	
02	Rec.dir.	27		42	-AR	53	
03		65	(y ^z)	43	Enter	41	
04	+ AR	52		44	Rec 0	14	
05	St.dir.	26		45	÷=	47	
06		65		46	St. 1	11	→ km ⁰
07	Cl AR	50		47	Rec.dir.	27	
08	1	61		48		41	
09	-AL	57		49	÷=	47	
10	Test 0	30		50	Enter	41	
11	Search	02		51	Rec. 1	15	
12		63		52	x=	46	
13	Rec.dir.	27		53	St. 2	12	→ km ⁰ (korrig.)
14		61		54	Write 1	24	
15	Enter	41		55	CR	71	
16	Rec.dir.	27		56	Write 1	24	
17		65		57	LF	70	
18	x=	46		58	Write 1	24	
19	+ AR	52		59	Print on	72	
20	Rec.dir.	27		60	Write 2	25	
21		63		61	K	13	
22	Enter	41		62	Write 2	25	
23	Rec.dir.	27		63	M	15	
24		64		64	Write 2	25	
25	x=	46		65	*	52	
26	-AR	53		66	Write 2	25	
27	St. 0	10	(Δ)	67	:	72	
28	Cl AR	50		68	Cl.displ.	76	
29	Rec.dir.	27		69	Rec. 2	16	
30		62		70	Write 1	24	
31	Enter	41		71	DP	33	
32	Rec.dir.	27		72	Cl AR	50	
33		63		73	Rec.dir.	27	
34	x=	46		74	2	62	
35	+AR	52		75	Enter	41	
36	Rec.dir.	27		76	Rec.dir.	27	
37		61		77		65	
38	Enter	41		78	x=	46	
39	Rec.dir.	27		79	+AR	52	

Schreibendes Program 502

111

Verify Program
1120

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Rec.dir.	27		40			
01		64		41			
02	x ²	45		42			
03	-AR	53		43			
04	Enter	41		44			
05	Rec. 0	14		45			
06	*=	47		46			
07	St. 0	10		47			
08	Write 1	24		48			
09	CR	71		49			
10	Write 1	24		50			
11	Print on	72		51			
12	Write 2	25		52			
13	V	26		53			
14	Write 2	25		54			
15	M	15		55			
16	Write 2	25		56			
17	A	01		57			
18	Write 2	25		58			
19	X	30		59			
20	Write 2	25		60			
21	*	52		61			
22	Write 2	25		62			
23	:	72		63			
24	Rec. 0	14		64			
25	Enter	41		65			
26	Rec.dir.	27		66			
27		32		67			
28	*=	47		68			
29	St. 3	13		69			
30	Write 1	24		70			
31	DP	33		71			
32	Cl AR	50		72			
33	Stop	01		73			
34				74			
35				75			
36				76			
37				77			
38				78			
39				79			

Schreibendes Program 503

I

Verify Program
3315

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	0	60		40	Col.set1	01	
01	St.dir.	26		41	Cl.displ.	76	
02		61		42	Mark	07	
03	St.dir.	26		43	4	64	
04		62		44	Rec.ind.	33	$\longleftrightarrow$ (s)
05	St.dir.	26		45	-Row	62	
06		63		46	St. 0	10	(s)
07	St.dir.	26		47	+AR	52	
08		64		48	Rec.dir.	27	
09	St.dir.	26		49		61	(km ⁰)
10		65		50	+AR	52	
11	St.dir.	26		51	St. 1	11	s + km ⁰
12		66		52	x ²	45	
13	St.dir.	26		53	St. 2	12	(s + km ⁰) ²
14		67		54	Cl AR	50	
15	St.dir.	26		55	Rec.dir.	27	
16		70		56		62	
17	St.dir.	26		57	Enter	41	
18		71		58	Rec. 0	14	
19	St.dir.	26		59	x=	46	
20		72		60	St. 3	13	(v ⁰ .s)
21	St.dir.	26		61	Enter	41	
22		73		62	Rec. 1	15	
23	St.dir.	26		63	≠	47	
24		74		64	St. 0	10	(f)
25	Rec.dir.	27		65	+AR	52	
26		42 $\rightarrow$ n		66	Rec.dir.	27	
27	St.dir.	26		67		63	
28		60 $\leftarrow$ n		68	+AR	52	
29	+AL	56 $\leftarrow$ n		69	St.dir.	26	
30	Rec. 1	15 $\rightarrow$ km ⁰		70		63	(Σf)
31	St.dir.	26		71	Cl AR	50	
32		61 $\leftarrow$ km ⁰		72	Rec. 0	14	
33	Rec. 0	14 $\rightarrow$ V ⁰		73	x ⁰	45	
34	St.dir.	26		74	+AR	52	
35		62 $\leftarrow$ V ⁰		75	Rec.dir.	27	
36	Rec.ind.	33		76		64	
37	Row set2	22		77	+AR	52	
38	Cl.displ.	76		78	St.dir.	26	
39	Rec.ind.	33		79		64	(Σf ²)

Schreibendes Programm 503

11

Verify Program
3455

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Cl AR	50		40		70	
01	Rec. 3	17		41	+AR	52	
02	Change s.	77		42	St.dir.	26	
03	Enter	41		43		70	$\Sigma v f$
04	Rec. 2	16		44	Cl AR	50	
05	$\pm =$	47		45	Rec. 2	16	
06	St. 1	11	(f')	46	Enter	41	
07	+AR	52		47	Rec. 1	15	
08	Rec.dir.	27		48	x=	46	
09		65	($\Sigma f'$)	49	+AR	52	
10	+AR	52		50	Rec.dir.	27	
11	St.dir.	26		51		71	
12		65	$\Sigma f'$	52	+AR	52	
13	Cl AR	50		53	St.dir.	26	
14	Rec. 1	15		54		71	$\Sigma v f'$
15	x^2	45		55	Cl AR	50	
16	+AR	52		56	Rec. 0	14	
17	Rec.dir.	27		57	Enter	41	
18		66		58	Rec. 1	15	
19	+AR	52		59	x=	46	
20	St.dir.	26		60	+AR	52	
21		66	$\Sigma f'^2$	61	Rec.dir.	27	
22	Cl. AR	50		62		72	
23	Rec.ind.	33		63	+AR	52	
24	Row col. +60	$\rightarrow v$		64	St.dir.	26	
25	St. 2	12	$\leftarrow v$	65		72	$\Sigma f f'$
26	x^2	45		66	Cl AR	50	
27	+AR	52		67	1	61	
28	Rec.dir.	27		68	-AL	57	
29		67		69	Test 0	30	
30	+AR	52		70	Search	02	
31	St.dir.	26		71	4	64	
32		67	Σv^2	72	Rec.dir.	27	
33	Cl AR	50		73		64	
34	Rec. 2	16		74	Enter	41	
35	Enter	41		75	Rec. dir.	27	
36	Rec. 0	14		76		66	
37	x=	46		77	x=	46	
38	+AR	52		78	St. 0	10	
39	Rec.dir.	27		79	Cl.displ.	76	

Verify Program
3418

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Rec. 0	14		40	-AR	53	
01	+AR	52		41	Enter	41	
02	Rec.dir.	27		42	Rec. 0	14	
03		72		43	≠	47	
04	x^2	45		44	St. 2	12	b_2
05	-AR	53		45	Cl AR	50	
06	St. 0	10	Δ	46	Enter	41	
07	Cl AR	50		47	Rec. 1	15	
08	Rec.dir.	27		48	≠	47	
09		66		49	+AR	52	
10	Enter	41		50	Rec.dir.	27	
11	Rec.dir.	27		51		61	
12		70		52	+AR	52	
13	$x=$	46		53	St.dir.	26	
14	+AR	52		54		73	km
15	Rec.dir.	27		55	Cl AR	50	
16		72		56	Rec. 1	15	
17	Enter	41		57	Enter	41	
18	Rec.dir.	27		58	Rec.dir.	27	
19		71		59		62	
20	$x=$	46		60	$x=$	46	
21	-AR	53		61	St.dir.	26	
22	Enter	41		62		74	v
23	Rec. 0	14		63	Cl. AR	50	
24	≠	47		64	Rec.dir.	27	
25	St. 1	11	b_1	65		67	
26	Cl AR	50		66	+AR	52	
27	Rec.dir.	27		67	Rec. 1	15	
28		64		68	Enter	41	
29	Enter	41		69	Rec.dir.	27	
30	Rec.dir.	27		70		70	
31		71		71	$x=$	46	
32	$x=$	46		72	-AR	53	
33	+AR	52		73	Rec. 2	16	
34	Rec.dir.	27		74	Enter	41	
35		72		75	Rec.dir.	27	
36	Enter	41		76		71	
37	Rec.dir.	27		77	$x=$	46	
38		70		78	-AR	53	
39	$x=$	46		79	Stop	01	

Verify Program
3157

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	St. 2	12		40	≠	47	
01	Cl. AR	50		41	√	44	
02	Rec.dir.	27		42	Enter	41	
03		60	n	43	Rec.AR	51	
04	+AR	52		44	x=	46	
05	2	62		45	St. 3	13	S.E. (V)
06	-AR	53		46	Cl.AR	50	(nicht korr.)
07	≠	47		47	Rec.dir.	27	
08	Enter	41		48		73	
09	Rec. 2	16		49	St. 0	10	km (nicht korr.)
10	x=	46		50	Rec.dir.	27	
11	√	44		51		74	
12	St. 2	12		52	St. 2	12	V (nicht korr.)
13	Cl AR	50		53	Write 1	24	
14	Rec. 2	16		54	CR	71	
15	Enter	41		55	Write 1	24	
16	Rec. 1	15		56	LF	70	
17	≠	47		57	Write 1	24	
18	+AR	52		58	Print on	72	
19	Rec.dir.	27		59	Write 2	25	
20		64		60	K	13	
21	Enter	41		61	Write 2	25	
22	Rec. 0	14		62	M	15	
23	≠	47		63	Write 2	25	
24	√	44		64	:	72	
25	Enter	41		65	Cl.displ.	76	
26	Rec.AR	51		66	Rec. 0	14	
27	x=	46		67	Enter	41	
28	St. 1	11	S.E. (km)	68	Rec.dir.	27	
29	Cl. AR	50	nicht korr.	69		41	↔ Korrektur- faktor f. s
30	Rec.dir.	27		70	≠	47	
31		62		71	Write 1	24	
32	Enter	41		72	DP	33	→ km
33	Rec. 2	16		73	Cl.displ.	76	
34	x=	46		74	Write 1	24	
35	+AR	52		75	Space	64	
36	Rec.dir.	27		76	Write 1	24	
37		66		77	Print on	72	
38	Enter	41		78	Write 2	25	
39	Rec. 0	14		79	S	23	

Schreibendes Programm 503

V

Verify Program
2492

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Write 2	25		40		32	für F
01	.	56		41	≠	47	
02	Write 2	25		42	Write 1	24	
03	E	05		43	DP	33	→ V _{max}
04	Write 2	25		44	Write 1	24	
05	.	56		45	Space	64	
06	Write 2	25		46	Write 1	24	
07	(	50		47	Print on	72	
08	Write 2	25		48	Write 2	25	
09	K	13		49	S	23	
10	Write 2	25		50	Write 2	25	
11	M	15		51	.	56	
12	Write 2	25		52	Write 2	25	
13	)	51		53	E	05	
14	Write 2	25		54	Write 2	25	
15	:	72		55	.	56	
16	Rec. 1	15		56	Write 2	25	
17	Enter	41		57	(	50	
18	Rec.dir.	27	Korrektur-	58	Write 2	25	
19		41	faktor f.S	59	V	26	
20	≠	47		60	Write 2	25	
21	Write 1	24		61	M	15	
22	DP	33	→ S.E. (km)	62	Write 2	25	
23	Write 1	24		63	A	01	
24	CR	71		64	Write 2	25	
25	Write 1	24		65	X	30	
26	Print on	72		66	Write 2	25	
27	Write 2	25		67	)	51	
28	V	26		68	Write 2	25	
29	Write 2	25		69	:	72	
30	M	15		70	Rec. 3	17	
31	Write 2	25		71	Enter	41	
32	A	01		72	Rec.dir.	27	Korrektur-
33	Write 2	25		73		32	faktor f.F
34	X	30		74	≠	47	
35	Write 2	25		75	Write 1	24	
36	:	72		76	DP	33	→ S.E. (V _{max})
37	Rec. 2	16		77	Stop	01	
38	Enter	41		78			
39	Rec.dir.	27	Korrektur-				
			faktor				

4. Zusammenfassung

- a. Aus Rattenembryonen (Tag 11 - 14 p.c.) wurde eine Hyaloplasma-Fraktion präpariert. Für die G-6-PD und 6-P-GD in dieser Fraktion wurden die optimalen Meßbedingungen für die Fermentkinetiken bestimmt.

Die G-6-PD war bei einer Substratkonzentration von 1 - 2 mM G-6-P gesättigt. Durch hohe G-6-P-Konzentrationen wurde das Ferment gehemmt. So wurden bei einer Konzentration von 50 mM G-6-P nur 75 % der optimalen Umsatzgeschwindigkeit gemessen. Mg^{++} -Ionen beeinflussten die Reaktionsgeschwindigkeit der G-6-PD nicht.

Die 6-P-GD erreichte bei einer Konzentration von 2 mM 6-P-G im Reaktionsansatz die maximale Umsatzgeschwindigkeit. Höhere 6-P-G-Konzentrationen hemmten die Reaktion nicht. Mg^{++} -Ionen aktivierten die 6-P-GD. Die optimale Konzentration lag bei 20 - 30 mM $MgCl_2$ im Versuchsansatz.

- b. Verschiedene Methoden wurden auf ihre Brauchbarkeit für eine kinetische Messung der G-6-PD in einer Cytosol-Fraktion aus Rattenembryonen untersucht. Ohne Zugabe von gereinigter 6-P-GD reagierten 10 - 50 % des gebildeten 6-P-G mit der im Versuchsansatz befindlichen 6-P-GD weiter. Gereinigte Hefe-6-P-GD erhöhte diesen Prozentsatz kaum. Dagegen reagierten nach Zusatz von frisch aus Leber-Hyaloplasma gereinigter 6-P-GD etwa 100 % 6-P-G weiter. Als zuverlässiger erwies sich die nach GLOCK und MCLEAN (1953) durchgeführte Substraktionsmethode. Durch den Hemmstoff 6-ANADP läßt sich die 6-P-GD auf 16 % hemmen, bei gleichzeitig verbleibender 90 %iger Aktivität der G-6-PD. Dieser Hemmstoff eignet sich daher nur bedingt für die ausschließliche Messung der G-6-PD-Aktivität bei gleichzeitiger Anwesenheit von 6-P-GD in einer Hyaloplasma-Präparation.

Die zweiwertigen Metall-Ionen Cu^{++} und Zn^{++} hemmen die 6-P-GD in embryonalem Gewebe. Die 6-P-GD ist bei einer Cu^{++} -Konzentra-

tion von 10^{-4} M zu etwa 50 % und bei 10^{-3} M zu praktisch 100 % gehemmt. Zn^{++} in einer Konzentration von 10^{-3} M hemmt die Reaktionsgeschwindigkeit der 6-P-GD auf 20 - 32 %. Die G-6-PD wird von den beiden untersuchten zweiwertigen Metall-Ionen nicht gehemmt.

- c. 6-ANADP hemmt die Fermente G-6-PD und 6-P-GD kompetitiv. Es konkurriert mit $NADP^+$ am Rezeptor. Für das embryonale Gewebe wurde für die G-6-PD bei den verschiedenen Präparationen und Auswertungsmethoden ein K_i -Wert zwischen $1,6$ und $3,9 \times 10^{-5}$ M 6-ANADP bestimmt. Die 6-P-GD reagiert gegenüber dem Hemmstoff wesentlich empfindlicher. Die K_i -Werte für dieses Ferment liegen je nach Auswertungsmethode zwischen 3×10^{-7} und 6×10^{-7} M für die Präparation aus 13-Tage-alten Rattenembryonen und zwischen 1×10^{-7} und $1,5 \times 10^{-7}$ M für das Lebergewebe erwachsener Ratten. Auch die Glutathionreduktase wird durch 6-ANADP kompetitiv gehemmt. Der K_i -Wert liegt zwischen 3×10^{-5} und 7×10^{-5} M 6-ANADP.
- d. Nach Vergiftung der Muttertiere mit 6-AN steigt der 6-P-G-Gehalt in dem embryonalen Gewebe an. Die 6-P-G-Konzentration ist von der Dosis und der Einwirkzeit abhängig. Bei 5 mg/kg 6-AN erreichte der 6-P-G-Gehalt nach 10 Stunden eine Konzentration von 260 ng 6-P-G / μ g DNA. Danach fällt die 6-P-G-Konzentration stark ab und erreicht nach ca. 50 Stunden Einwirkzeit von 6-AN auf die Muttertiere wieder fast normale Werte von 8 ± 1 ng 6-P-G / μ g DNA.
- e. Mit Hilfe von in-vitro-Versuchen wurden Rattenembryonen 6-AN-vergifteter Muttertiere ^{14}C -radioaktiv markierte Glucose, Acetat und die Aminosäuren Leucin, Glycin und Asparaginsäure angeboten.

Vier Stunden nach Applikation von 8 mg/kg 6-AN an die Muttertiere ist der Einbau von $6-^{14}C$ -Glucose in den Ribose-Anteil der RNA durch die Embryonen vermindert. Der Einbau von $1-^{14}C$ -Glucose bleibt vollständig normal. Nach 10-stündiger Behandlung der Muttertiere ist die Glucose-Aufnahme durch den Embryo vermindert und der Einbau von ^{14}C -Glucose in die Zellfraktionen Lipide, RNA, DNA und Proteine auf

ca. 50 % der Kontrollen abgefallen. Nach einer Behandlungszeit der Muttertiere von 12 Stunden ist der Einbau von ^{14}C -markierten Aminosäuren sowie markiertem Acetat in die entsprechenden Zellbestandteile Proteine und Lipide nicht gehemmt.

- f. Werden trächtige Ratten am Tag 11 der Schwangerschaft mit 5 - 8 mg/kg 6-AN behandelt, so kommt es zu einer dosisabhängigen Retardierung der Foeten am Tag 20.

Der DNA-Zuwachs von Tag 11 nach Tag 12 der Schwangerschaft ist bei den behandelten Tieren geringer als bei den Kontrolltieren. Dieser Wachstumsrückstand wird an den folgenden Tagen der Schwangerschaft nicht aufgeholt. Der DNA-Quotient Kontrolle / 6-AN-behandelt bleibt vom Tag 12 bis Tag 16 nahezu konstant (ca. 1,8).

- g. 6-AN verursacht bei den Muttertieren eine Hypothermie. Wird durch die Änderung der Umgebungstemperatur die Körpertemperatur auf normale Werte angehoben, so steigt die embryotoxische Wirkung. Umgekehrt kann sich durch eine - über die durch 6-AN bedingte Hypothermie hinausgehende - Senkung der Körpertemperatur die 6-AN-Wirkung auf den Embryo abschwächen.
- h. Für die statistische Berechnung der Michaelis-Konstante und der maximalen Umsatzgeschwindigkeit aus den Meßwerten einer Fermentkinetik wurde die Rechenvorschrift von WILKINSON für eine Rechenmaschine (WANG Modell 370) programmiert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

ATKINSON, M.R.; J.F. JACKSON and R.K. MORTON:

Nicotinamide Mononucleotide Adenyltransferase of Pig-Liver Nuclei.

Biochem. J. 80, 318 - 323, 1961

BRINSTER, R.L.:

Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase Activity in the Preimplantation Mouse Embryo.

Biochem. J. 101, 161 - 163, 1966

BRODIE, A.F. and F. LIPMANN:

Identification of a Gluconolactonase.

J. Biol. Chem. 212, 677 - 685, 1955

BRUNNEMANN, A.; H. COPER:

Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des 6-Aminonicotinamids.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 246, 63, 1963

BRUNNEMANN, A.; H. COPER und D. NEUBERT:

Biosynthese und Wirkung des 6-Aminonicotinamid-adenininderivats.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmacol. 246, 437 - 451, 1964

BURTON, K: A study of the conditions and mechanism of the reaction for colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.

Biochem. J. 62, 315 - 323, 1956

CHAMBERLAIN, J.G.: Development of Cleft Palate Induced by 6-Aminonicotinamide Late in Rat Gestation.

Anat. Record 156, 31 - 40, 1966

CORI, O. and F. LIPMANN:

The Primary Oxidation Product of Enzymatic Glucose-6-Phosphate Oxidation.

J. Biol. Chem. 194, 417 - 425, 1952

COPER, H. und H. HERKEN:

Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten des Nicotinsäureamids.

Dtsch. med. Wschr. 41, 1979 - 1990, 1963

COPER, H. und D. NEUBERT:

Einfluß von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit
einiger NADP-bedürftiger Oxydoreduktasen.

Biochim. Biophys. Acta, 89, 23 - 32, 1964

COPER, H.; H. HADASS; H. LISON:

Untersuchungen zum Mechanismus zentralnervöser Funktionstörungen
durch 6-Aminonicotinamid.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. u. exp. Path. 255, 98 - 106, 1966

COPER, H.; H. LISON; H. ROMMELSPACHER; G. SCHULZE and S. STRAUSS:

The Influence of Adrenergic Receptor-Blocking Agents, Amphetamine,
and 6-Aminonicotinamide on Thermoregulation.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 270, 378 - 391, 1971

DIXON, M. and E.C. WEBB:

Enzyme Techniques.

In: Enzymes, Academic Press Inc., 8 - 34, 1958

DOWD, J.E. and D.S. RIGGS:

A Comparison of Estimates of Michaelis-Menten Kinetic Constants
from Various Linear Transformations.

J. Biol. Chem. 240, 863 - 869, 1965

GLASER, L. and H. BROWN:

Purification and properties of D-glucose-6-phosphate dehydrogenase

J. Biol. Chem. 216, 67 - 78, 1955

GLOCK, G.E. and P. McLEAN:

Further Studies on the Properties and Assay of Glucose-6-Phosphate
Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase of Rat Liver.

Biochem. J. 55, 400 - 408, 1953

GOLDSTEIN, M.; M.F. PINSKY and F.C. FRASER:

Genetically determined organ specific responses to the teratogenic
action of 6-aminonicotinamide in the mouse.

Genet. Res. Camb. 4, 258 - 265, 1963

HERKEN, H.: Mechanism of action of drug toxicity.

Proc. 3rd Intern. Pharmacological Meeting, Pergamon Press,

Oxford-New York 4, 3, 1968

HERKEN, H.; K. LANGE and H. KOLBE:

Brains disorders induced by pharmacological blockade of the pentose phosphate pathway.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 93 - 100, 1969

HERKEN, H. and K. LANGE:

Blocking of Pentose Phosphate Pathway in the Brain of Rats by 6-Aminonicotinamide.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. exp. Path. 263, 496 - 499, 1969

HORECKER, B.L. and P.Z. SMYRNIOTIS:

Reversibility of Glucose-6-Phosphate Oxidation.

Biochim. Biophys. Acta 12, 98 - 102, 1953

HORECKER, B.L. and P.Z. SMYRNIOTIS:

Phosphogluconic Acid Dehydrogenase from Yeast.

J. Biol. Chem. 193, 371 - 381, 1951

JOHNSON, W.J. and J.D. McCOLL:

6-aminonicotinamide - a potent nicotinamid antagonist.

Science 122, 834, 1955

JOHNSON, W.J. and J.D. McCOLL:

Antimetabolite activity of 6-aminonicotinamide.

Federation Proceedings 15, 284, 1956

KOEHLER, E. und D. NEUBERT:

Aktivität NADP-bedürftiger Oxydoreduktasen In embryonalem Gewebe der Ratte.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. exp. Path. 260, 154 - 156, 1968

KOEHLER, E.; H.-J. BARRACH and D. NEUBERT:

Inhibition of NADP dependent Oxidoreductases by the 6-Aminonicotinamide Analogue of NADP⁺.

FEBS Letters 6, 225 - 228, 1970

KOEHLER, E.: Untersuchungen über den Stoffwechsel während der Differenzierungsphase der Ratte und über die Beeinflussbarkeit durch Pharmaka.
Habilitationsschrift, F.U. Berlin, 1970

KORNBERG, A.: Enzymatic Synthesis of Triphosphopyridine Nucleotide.

J. Biol. Chem. 182, 805 - 813, 1950

KORNBERG, A. and B.L. HORECKER:

Glucose-6-phosphate dehydrogenase.

In: Methods In Enzymology, Academic Press, New York,
1, 323 - 334, 1955

LANGE, K. and E.R. PROFT:

Inhibition of the 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in the
Rat Kidney by 6-Aminonicotinamide.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 267, 177 - 180, 1970

LEVY, H.R.: The Pyridine Nucleotide Specificity of Glucose-6-Phosphate
Dehydrogenase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 49 - 53, 1961

LEVY, H.R.: The Interaction of Mammary Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
with Pyridine Nucleotides and 3- β -Hydroxyandrost-5-en-17-one.

J. Biol. Chem. 238, 775 - 784, 1963

LISON, H.: Untersuchungen zur Differenzierung der durch 6-Aminonicotin-
amid, einem Antimetaboliten des Nicotinamids, hervorgerufenen zentral-
nervösen Funktionsstörung.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 267, 155 - 169, 1970

LÖHR, G. und H.D. WALLER:

In: BERGEMEYER: Methoden der enzymatischen Analyse,
Verlag Chemie, 744 - 751, 1962

LOWRY, O.H.; J.H. PASSONNEAU; D.W. SCHULZ and M.K. ROCK:

The Measurement of Pyridine Nucleotides by Enzymatic Cycling.

J. Biol. Chem., 236, 2746 - 2755, 1961

MATTENHEIMER, H.: Enzymbestimmungen in Gewebeproben

3. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Mikromethoden, 2. Auflage, 168 - 169, 1966

MCLEAN, P.: Carbohydrate Metabolism of Mammary Tissue I.

Biochem. Biophys. Acta 30, 303 - 315, 1958

MURPHY, M.L.; C.P. DAGG and D.A. KARNOFSKY:

Comparison of Teratogenic Chemicals in the Rat and Chick Embryos.

Pediatrics 19, 701 - 714, 1957

NANNI, G.; U.M. MARINARI and F.M. BACCINO:

Metabolic modifications of mitochondria following treatment
with 6-aminonicotinamide.

Ital. J. Biochem. 10, 275 - 282, 1961

NEUBERT, D.; H.-J. MERKER; E. KOEHLER; R. KROWKE and H.-J. BARRACH:

Biochemical Aspects of Teratology.

Advances in the Biosciences 6, 575 - 622, 1971

NOLTMANN, E.A. and S.A. KUBY:

D-Glucose-6-P and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase

The Enzymes 7, 223 - 242, 1963, Academic Press

PARR, C.W.: Inhibition of Phosphoglucose Isomerase.

Nature 178, 1401, 1956

PARR, C.W.: Competitive Inhibitors of Phosphoglucose Isomerase.

Biochem. J. 65, 34P, 1957

PINSKY, L. and F.C. FRASER:

Congenital malformations after a two-hour inactivation of nicotinamide
in pregnant mice.

Brit. med. J. 2, 195 - 197, 1960

PONTREMOLI, S.; DE FLORA, E. GRAZI; G. MANGIAROTTI; A. BONSIGNORE and

B.L. HORECKER: Crystalline D-Gluconate 6-Phosphate Dehydrogenase.

J. Biol. Chem. 236, 2975 - 2980, 1961

RAPOPORT, S.M.: Stoffwechsel der Nucleinstoffe.

In: Medizinische Biochemie, 4. Auflage, 484 - 496, 1966

SANWAL, B.D.: Regulatory Mechanisms Involving Nicotinamide Adenine

Nucleotides as Allosteric Effectors, III. Control of Glucose-
6-Phosphate Dehydrogenase.

J. Biol. Chem. 245, 1626 - 1631, 1970

SCHMIDT, G. and S.J. THANNHAUSER:

A methode for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic
acid and phosphoproteins in animal tissues.

J. Biol. Chem. 161, 83 - 89, 1945

WILKINSON, G.N.: Statistical Estimations in Enzyme Kinetics.

Biochem. 80, 324 - 332, 1961

Hans-Jürgen Barrach
1 Berlin 31
Seesener Str. 16

L E B E N S L A U F
=====

Geburtsdatum	7. April 1940, in Berlin
Vater	Johannes Barrach (Kürschnermeister)
Mutter	Irmgard Barrach, geb. Schönberger
1946 - 1951	Besuch der 9. Grundschule Berlin-Prenzlauer Berg
1951 - 1952	Besuch der 13. Grundschule Wilmersdorf
1952 - 1956	Besuch der 2. Oberschule des Technischen Zweiges
Frühjahr 1956	Abschlußprüfung des Technischen Zweiges
1956 - 1959	Kürschnerlehre
März 1959	Gesellenprüfung
1959 - 1962	Kürschnergeselle
1962 - 1964	Besuch des Berlin-Kollegs
Herbst 1964	Abitur
1964 - 1971	Medizinstudium an der F.U. Berlin
Herbst 1965	Vorphysikum
Frühjahr 1968	Physikum
Herbst 1971	Staatsexamen
Herbst 1968 - 1972	Doktorand im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

